

**Untersuchungen zum Mechanismus
der Hämoglobinbildung bei der chronischen
Kupfervergiftung der Wiederkäuer**

Kurt Steiner

1973

Aus dem Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

(Komm. Vorstand: Professor Dr. J. Kalich)

UNTERSUCHUNGEN ZUM MECHANISMUS DER HÄMIGLOBINBILDUNG
BEI DER CHRONISCHEN KUPFERVERGIFTUNG DER WIEDERKÄUER

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Kurt Steiner

aus
München

München 1973

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München

Dekan: Prof. Dr. E. Dahme

Referent: Prof. Dr. A. Schmid

Korreferent: Prof. Dr. J. von Sandersleben

Tag der Promotion: 23. Februar 1973

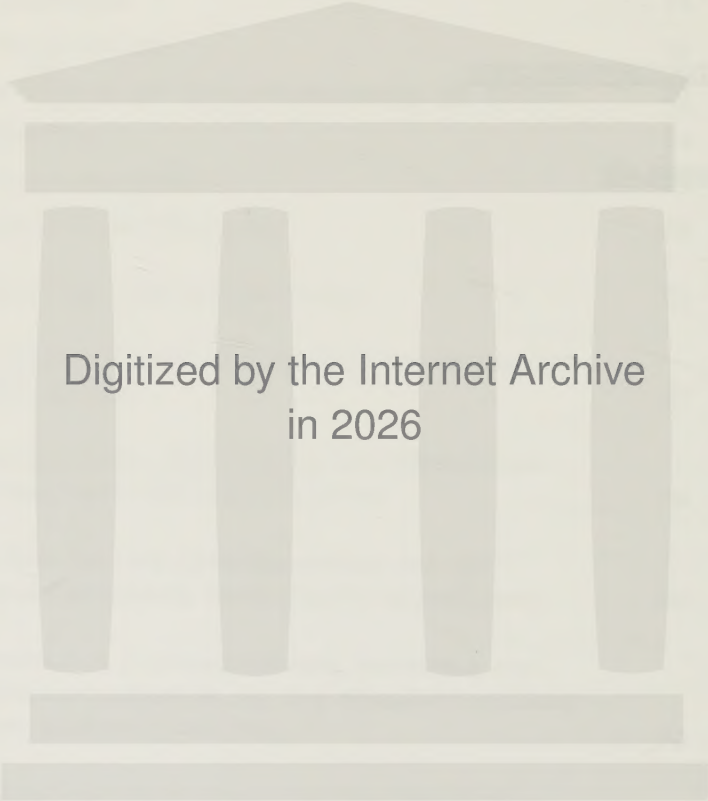


INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. <u>LITERATUR</u>	
1. Physiologische Bedeutung des Kupfers	3
2. Supplementierung des Futters mit Kupfer	4
3. Die chronische Kupfervergiftung	5
3.1. Vorkommen und Bedeutung	5
3.2. Toxische Dosen	6
3.3. Stoffwechsel des Kupfers	7
3.3.1. Resorption	7
3.3.2. Verteilung im Organismus	10
3.3.3. Speicherung	13
3.3.4. Ausscheidung	15
3.4. Klinisches Vergiftungsbild	16
3.5. Pathologisch-anatomisches Vergiftungsbild	18
3.6. Pathogenese	20
3.7. Therapiemaßnahmen	22
3.8. Offene Probleme	23
4. Hämoglobinbildung und Hb(III)-Bildner	24

	Seite
III. <u>EIGENE UNTERSUCHUNGEN</u>	28
1. Hämoglobinbildung durch Kupfer(II)-acetat	28
1.1. Reagenzien	28
1.2. Versuchstiere	29
1.3. Gewinnung und Gerinnungshemmung des Blutes	29
1.4. Hämolyse	29
1.5. Versuchsansätze	29
1.6. Extinktionsermittlung	29
2. Kinetik der Hämoglobinbildung	31
3. Hämoglobinbildung als Funktion der Kupfer(II)-Konzentration	33
4. Artspezifische Unterschiede der Hämoglobinbildung durch Kupfer(II)-acetat	36
5. Einfluß der Erythrozytenmembran auf die Hämoglobinbildung durch Kupfer(II)-chlorid	40
6. Tierartlich unterschiedliche Bedeutung der Erythrozytenmembran für die Hämoglobinbildung durch Kupfer(II)-chlorid	43
7. Einfluß des Blutplasmas auf die Hämoglobinbildung durch Kupfer(II)-acetat	47
IV. <u>DISKUSSION</u>	52

	Seite
V. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	59
<u>SUMMARY</u>	61
VI. <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	63
<u>LEBENS LAUF</u>	



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I. EINLEITUNG

Chronische Kupfervergiftungen wurden in Deutschland schon um das Ende der Dreißiger Jahre in der Nähe von Kupferbergwerken beschrieben (15, 30, 162). In den letzten zwei Jahrzehnten wurde die Intoxikation vor allem in England, Australien und Neuseeland bei Schafen beobachtet (22, 48). Vor einigen Jahren trat wieder in Deutschland die Kupfervergiftung bei Kälbern auf (9, 154).

Hauptursachen der Vergiftung waren kupferhaltige Lecksteine, Pflanzenschutzmittel, Kraftfuttermischungen, sog. Milchaustauscher und - besonders in Australien - bestimmte Pflanzen, die zur Kupferspeicherung in der Leber führen (22, 48).

Die Speicherung kann monatelang ohne klinische Symptome verlaufen. Aus noch weitgehend unbekannten Gründen kommt es dann zum plötzlichen Freiwerden des Kupfers aus der Leber. Dadurch wird die sog. "hämolytische Krise" ausgelöst. Dieses Stadium ist gekennzeichnet durch ein rasches Absinken des Blutglutathionspiegels, eine Schädigung der Erythrozytenmembran und eine progressive Bildung von Hämoglobin (Hb(III)). Die Kupfervergiftung wird klinisch manifest und führt innerhalb von zwei bis drei Tagen unter subakuter Leberdystrophie bzw. Leberzirrhose mit akuter Zellnekrose und unter akuter Glomerulo- und Tubulonephrose zum Tod. Die Hämoglobinoxidation zu Hämoglobin, die bei Kälbern bis zu 60% betragen kann, ist im Hinblick auf die ausgeprägte Dyspnoe im Endstadium der Erkrankung als die eigentliche Todesursache anzusehen (9, 144, 146).

Als Beitrag zum Mechanismus der Hämoglobinbildung wurde in folgender Arbeit untersucht

- ob die Oxidation von Hämoglobin bei der hämolytischen Krise mit der hohen Kupferkonzentration im Blut zusammenhängt,
- welche Kinetik die Hämoglobinbildung aufweist,
- welche Bedeutung der Erythrozytenmembran bei der Hämoglobinbildung zukommt und

- ob sich die bekannten tierartlichen Empfindlichkeitsunterschiede bei der chronischen Kupfervergiftung auf eine artspezifische Resistenz der Erythrozytenmembran und/oder eine unterschiedliche Oxidabilität des Hämoglobins zurückführen lassen.

II. LITERATUR

1. Physiologische Bedeutung des Kupfers

Kupfer ist wie Eisen und Mangan ein autoxidables Metall, d.h. ein Element, das direkt mit molekularem Sauerstoff reagieren kann (36). Nach BRENNER (18) greift es wegen seiner kleinen Ionengröße und der relativ hohen Ladung intensiv in den intrazellulären Stoffwechsel ein. Kupfer besitzt die Fähigkeit, besonders mit komplexen Verbindungen Elektronen auszutauschen (36, 82). Aus dem gleichen Grund ist es als Redoxkatalysator an biochemischen Umsetzungen beteiligt (82). Es ist "Funktionselement" zahlreicher Oxidationsfermente und erfüllt im Rahmen der Blutbildung, des intermediären Zellstoffwechsels und des Pigmentstoffwechsels wichtige Aufgaben (69).

Eine wichtige physiologische Rolle spielt Kupfer bei der Synthese von Hämoglobin und anderen Hämiproteiden. Das zeigen zum Beispiel die Versuche von ELVEHJEM und SHERMAN (38); es ist neben dem Eisen für die Erythropoese von Bedeutung. MARSTON und ALLEN (95) vermuten, daß Kupfer dabei das Eisen aus den Speicherdepots der Leber mobilisiert und damit für die Synthese des Blutfarbstoffes zur Verfügung stellt. Eine unzureichende Kupferversorgung führt bei Rindern, Schafen, Schweinen und Hühnern zu einer Anämie (76).

Kupfermangelerscheinungen sind bei Haustieren nicht selten. Neben einer Anämie werden Störungen der biologischen Oxidation, der Pigmentsynthese, der Knochenbildung, des Nervensystems und der Fortpflanzung beschrieben (76). Der Kupfermangel äußert sich bei Schafen in Form einer unzureichenden Keratinisierung. Dadurch verliert die Wolle ihre Kräuselung und Elastizität und kann leicht brechen (93, 94). Bei ausgeprägtem Kupfermangel zeigen schwarze Schafe ein graues Vlies, während sich das schwarze Fell von Rindern rostfarben verändert. Dieser Vorgang wird mit der stark verminderten Aktivität der Tyrosinase und der daraus resultierenden

mangelhaften Melaninsynthese erklärt (44). Lämmer zeigen bei unzureichender Kupferversorgung der Muttertiere Bewegungsstörungen, die bis zur völligen Lähmung führen können. Die Erkrankung wird als "Swayback" bezeichnet und ist durch eine symmetrische Demyelinisierung des Großhirns mit verschiedenen starker Erweiterung der Ventrikel und durch Degeneration der motorischen Fasern charakterisiert (8). Experimentell erzeugter Kupfermangel ruft bei Hunden, Schweinen und Küken schwere Skelettschäden hervor in Form von Auftreibungen an den Epiphysen der Röhrenknochen, starken Verdünnungen der Cortex der Diaphyse und verzögerten Verknöcherungen (46, 47).

2. Supplementierung des Futters mit Kupfer

Zur Vermeidung der Kupfermangelerkrankungen und zur Steigerung der Wachstumsrate wird das Futter unserer Haustiere mit Kupfer angereichert. Für die normale Kupferversorgung werden folgende Bedarfswerte angegeben:

Rind	5-10 ppm i.T. des Futters (72)
Schaf	1-14 ppm i.T. des Futters (150) und
Kalb	6 mg pro Tag in der Milchdiät (96)

Diese Mindestbeimengungen sind heute in allen Kraftfuttermischungen und in den sog. Milchaustauschern enthalten. In den letzten Jahren wurden zunehmend erhöhte Kupferzusätze, die teilweise den zehnfachen Bedarfswert erreichten, im Futter von Schafen und Kälbern festgestellt (9, 155). Die Gründe für diese überhöhte Supplementierung sind nur so zu deuten, daß man sich eine günstige Beeinflussung des Wachstums, ähnlich wie beim Schwein (6, 73), erhoffte. Ein weiteres Motiv mag die adstringierende Wirkung des Kupfers im Hinblick auf die häufigen Kälberdurchfälle gewesen sein (155). Der hohe Kupfergehalt des Futters führte bei Schafen und Kälbern zu chronischen Vergiftungsfällen, die sehr häufig letal endeten. Milchaustauscher und Kraftfuttermischungen für Schafe sollen aus diesem Grunde nicht mehr als 10 ppm Kupfer i.T. enthalten (11), während bei Kälbern Milchaustauscher mit mehr als 30 ppm Kupfer i.T. eine beträchtliche Gefährdung darstellen (155).

3. Die chronische Kupfervergiftung

3.1 Vorkommen und Bedeutung

In der Literatur findet sich eine Vielzahl von Berichten über das Auftreten der chronischen Kupfervergiftung bei Haustieren (2, 3, 7, 15, 21, 25, 30, 55, 56, 58, 63, 77, 110, 116, 119, 126, 131, 134, 136, 139, 141, 142, 143, 145, 149, 150, 154, 155, 159, 162). Die Erkrankung wird hauptsächlich bei Schafen und Kälbern beschrieben.

Vergiftungsursachen sind beim *S c h a f* zum Beispiel kupfersulfathaltige Spritzmittel, die als Insektizide in Obstbaugebieten verwendet werden. Im Südosten Englands, wo Schafe in Obstgärten geweidet werden, ist diese Art der Vergiftung häufig vorgekommen. Andere Intoxikationsfälle resultieren aus Wurmkuren mit kupferhaltigen Anthelmintika, aus Kupferlecksteinen, aus Mineralfuttermischungen und aus Milchaustauschern mit hohem Kupferanteil. Besondere Vergiftungsbedingungen herrschen in Australien, wo die Erkrankung eine große wirtschaftliche Bedeutung erlangt hat. Sie tritt bevorzugt in Neusüdwaales und in Viktoria auf und wird als "enzootic jaundice" bzw. als "toxämie jaundice" bezeichnet. Es werden hauptsächlich drei Ursachen beschrieben:

1. Ein hoher Kupfergehalt des Bodens und damit der darauf wachsenden Futterpflanzen.
2. Eine Kleeart, *Trifolium subterraneum*; sie kann unter besonderen klimatischen Bedingungen als dominierende Pflanze in Weidegebieten auftreten. Da sie nur wenig oder kein die Kupferresorption hemmendes Molybdän enthält, kommt es zu einer ungewöhnlich hohen Kupferaufnahme und zu einer starken Kupferspeicherung in der Leber.
3. Eine Leberschädigung mit Hemmung der Kupferausscheidung via Galle bei Aufnahme von toxischen Alkaloiden aus *Heliotropium europaeum*, *Echium plantagineum* und *Senecio jacobaea*. Diese Pflanzen sind besonders in Neuseeland als Vergiftungsursachen bekannt geworden (22).

Durchschnittlich betragen die Tierverluste in Schafherden 15 - 20%, es können aber auch in seltenen Fällen bis zu 50% der Tiere betroffen sein (26).

In den letzten Jahren sind auch bei Kälbern vermehrt Fälle von chronischer Kupfervergiftung aufgetreten (2, 23, 131, 154). Ursachen waren dabei fast ausschließlich Milchaustauscher und Kälbernährmehle mit zu hohem Kupferanteil (155).

Bei den anderen Tierarten spielt die chronische Kupfervergiftung eine weniger bedeutende Rolle als bei Wiederkäuern. Es sind aber Vergiftungsfälle berichtet worden. Bei Pferden wurden zum Beispiel Leberzirrhose, Ikterus und Herzfunktionsstörungen nach ständiger Inhalation von kupferhaltigem Flugstaub in der Nähe eines Kupferbergwerkes diagnostiziert (15). Bei Schweinen führte eine erhöhte orale Kupferaufnahme nach mehreren Monaten zu generalisiertem Ikterus (21, 55). Auch Hühner können mit Kupfer chronisch vergiftet werden. Dazu sind allerdings hohe Dosen nötig, die gastro-intestinale Läsionen und hämolytische Anämien bewirken, wie sie bei der akuten Intoxikation bekannt sind (20, 97, 101, 152).

3.2. Toxische Dosen

Das Schaf hat von allen Haustieren nicht nur den geringsten Kupferbedarf, es reagiert auch am empfindlichsten auf erhöhte Kupfermengen. Wie erwähnt, sollen Milchaustauscher und Mineralfuttermischungen einen Kupfergehalt von höchstens 10 ppm i.T. enthalten (11). Bei Kälbern werden nach den Erfahrungen von WEISS et al. (155) Kupferwerte über 30 ppm in den Milchaustauschern als bedenklich erachtet. Bei den weniger gefährdeten Tierarten sind wesentlich höhere Dosen symptomlos vertragen worden. Für das Schwein können 250 ppm i.T. giftig sein. Schon bei 100 ppm besteht ein gewisses Vergiftungsrisiko, wenn eine gleichmäßige Durchmischung nicht gewährleistet ist (48). Auch für junge Küken stellt ein hoher Kupfergehalt in den Mischfuttermitteln eine beträcht-

liche Gefahr dar. Von MAYO et al. (97) ist festgestellt worden, daß 325 ppm Kupfer Wachstumsverminderung und Muskeldystrophie verursachen. Genaue toxische Dosen für das Geflügel sind jedoch nicht anzugeben, da zum Beispiel GOLDBERG et al. (52) bereits nach einer täglichen Verfütterung von 100 ppm Schwäche und hämolytische Anämie beobachtete, während nach MEHRING et al. (101) Kupferkonzentrationen von 500 ppm im Futter ohne Krankheitserscheinungen vertragen werden.

3.3. Stoffwechsel des Kupfers

3.3.1 Resorption

In der Regel wird nur ein geringer Teil des Nahrungskupfers resorbiert. Für den Menschen werden Werte von 5 - 40% angegeben (31) und bei Schweinen beträgt der resorbierte Anteil 2,9 - 9,7% in Abhängigkeit vom Kupfergehalt des Futters (17).

Als Ort der Resorption wird allgemein der Dünndarm angesehen; es scheinen jedoch artspezifische Unterschiede bezüglich der oberen und unteren Darmabschnitte zu bestehen. SACHS et al. (123) legten beim Hund sogenannte THIRY-Fisteln an, um die Lokalisation der Resorption im Dünndarm festzustellen. Dabei wurden die oberen, mittleren und unteren Teile des Dünndarms isoliert und die Menge des resorbierten Kupfers gemessen. Die Versuche ergaben, daß Kupfer vor allem im oberen Dünndarmabschnitt resorbiert wird. Auch beim Menschen sind hauptsächlich die oberen Dünndarmabschnitte an der Kupferaufnahme beteiligt (123), während beim Schwein bevorzugt der untere Dünndarm und das Colon (17) und beim Hamster das gesamte Ileum resorbieren (28).

Der Resorptionsmechanismus des Kupfers ist noch weitgehend ungeklärt. GITLIN et al. (51) vermuten aufgrund ihrer Versuche an Mäusen, daß der Kupferaufnahme ein vielschichtiger enzymatischer Vorgang zugrunde

liegt. Versuche von CRAMPTON et al. (28) zeigen, daß die Kupferresorption keine einfache Diffusion sein kann. Bei ihren Untersuchungen an isolierten Hamsterdärmen stellten die Autoren nämlich fest, daß keine lineare Beziehung zwischen der Kupferkonzentration im Darmlumen und dem Kupfertransport durch die Darmwand besteht. Er kann nach Erreichen einer Grenzkonzentration von 10^{-6} g/ml im Darmlumen nicht mehr gesteigert werden, obwohl bei höheren Konzentrationen die Kupferaufnahme in die Darmwand beträchtlich ansteigt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Kupferaufnahme durch die Darmmucosa aus dem Lumen und die Kupferabgabe von der Darmwand an das Blut getrennte Vorgänge darstellen. Die Aufnahme des Kupfers in die Darmwandzellen ist im Gegensatz zur Kupferabgabe von Stoffwechselenergie unabhängig.

Die Kupferresorption aus dem Verdauungskanal wird durch zahlreiche Faktoren sowohl im Sinne einer Förderung als auch einer Hemmung beeinflusst.

Eine R e s o r p t i o n s f ö r d e r u n g verursacht die Salzsäure des Magens. Das läßt sich an gastrektomierten Tieren demonstrieren, bei welchen der Kupfergehalt der Leber rasch abnimmt und nach 5 Monaten fast verschwunden ist (12). Gleichfalls resorptionsfördernd wirken verschiedene Aminosäuren, die unter Bildung von Komplexverbindungen mit Kupfer reagieren. Dies dürfte damit zusammenhängen, daß Aminosäuren den Kupfertransport durch biologische Membranen - nach SARKAR und KRUCK (125) wegen der kleinen Molekülgröße der Komplexe - erleichtern. Auch zwischen den einzelnen Aminosäurekomplexen bestehen offenbar Resorptionsunterschiede, denn Kupfer wird in Form der monomeren Komplexe besser aufgenommen als in Form der di-, tri- und polymeren (75). Eine weitere Rolle spielt die Konfiguration der Aminosäuren, da sich zeigen ließ, daß die L-Formen besser resorbiert werden als die D-Stereoisomeren (75). Eine Förderung der Kupferresorption beim Schwein ist auch bei Zugabe verschiedener Antibiotica

zum Futter beobachtet worden (71). Besonders gut scheint Kupfer jedoch als Glykocholat resorbiert zu werden (103).

Neben diesen Anionen und Komplexbildnern ist eine Steigerung der Kupferresorption auch von Kationen, vor allem von Eisen bekannt (70). Sie ist möglicherweise als Ausschaltung kupferbindender Nahrungskomponenten zu verstehen. Schließlich soll nicht unerwähnt bleiben, daß die Kupferresorption, ebenso wie die Resorption vieler anderer Elemente und Verbindungen, auch eine Abhängigkeit vom Alter aufweist. Sie ist, wie an wachsenden Ratten gezeigt werden konnte, bei Säuglingen am besten und nimmt mit steigendem Alter ab (106).

Eine Hemmung der Kupferresorption ist von Nahrungsbestandteilen zu erwarten, die mit Kupfer schwerlösliche oder schlecht resorbierbare Verbindungen bilden. Ein klassisches Beispiel für den ersteren Fall sind Schwefelwasserstoff oder lösliche Sulfide, wie sie unter anderem im Pansen der Wiederkäuer entstehen. Sie bilden schwerlösliches und damit unresorbierbares Kupfersulfid (16, 17, 136). Zu den schlecht resorbierbaren Verbindungen zählen Sulfate. Sie hemmen, wie von Glaubersalz (Na_2SO_4) bekannt ist, die Wasserresorption und besitzen deshalb eine mehr oder weniger laxierende Wirkung. Auf diese Weise läßt sich der von DICK (33) bei Rindern und Schafen beobachtete indirekte Kupfermangel nach Verabreichung von Futter mit hohem Sulfatgehalt relativ einfach erklären. Auf völlig andere Weise, wahrscheinlich durch Konkurrenz um gemeinsame Resorptionsmechanismen, kommt die von Molybdän bekannte Hemmung der Kupferresorption zustande (33). Sie kann, wie GRAY und DANIEL (57) an der Ratte gezeigt haben, so stark sein, daß die Hämoglobinbildung, besonders bei gleichzeitiger Verabreichung von Sulfat, beeinträchtigt wird. Weniger gut erklärbar ist schließlich die an Rindern beobachtete Einschränkung der Kupferresorption durch Kalzium (70, 72). Sie beruht möglicherweise auf einer Abpufferung der Salzsäure des Magens, auf deren Bedeutung für die Kupferresorption bereits hingewiesen wurde.

3.3.2. Verteilung im Organismus

Die Verteilung des resorbierten Kupfers erfolgt durch das Blut. Die physiologische Konzentration im Blut ist bei den einzelnen Species verschieden. Bei den Haustieren geben EVANS und WIEDERANDERS (39) folgende Werte an: Hund 67, Rind 91, Schaf 115, Ratte 123 und Schwein 215×10^{-6} g/100 ml Plasma. Der normale Kupfergehalt des menschlichen Blutes liegt bei etwa 100×10^{-6} g/100 ml (69). Diese Konzentrationen werden innerhalb eines Schwankungsbereiches von $\pm 30\%$ auffallend konstant gehalten (69). Sie werden durch die orale Kupferzufuhr nur wenig beeinflusst. Bei Verdoppelung des Kupfergehaltes im Futter steigt die Konzentration des Blutkupfers beim Schaf nur geringgradig von 71 auf 90×10^{-6} g/100 ml an (34). Bei neugeborenen Schafen werden sehr häufig niedrige Blutkupferkonzentrationen gemessen. Der normale Kupferspiegel wird beim Schaf allerdings bereits nach drei Tagen post partum erreicht (99). Die Kupferkonzentrationen im Serum von Kälbern erhöhen sich von sehr niedrigen Werten nach der Geburt (26×10^{-6} g/100 ml) innerhalb von 10 Tagen auf das Vierfache. Im Gesamtblut verläuft der Anstieg langsamer und erreicht nach 10 Tagen die doppelte Höhe des Ausgangswertes (59). Bei der Ratte sind die Plasmakupferwerte bei der Geburt am niedrigsten, steigen innerhalb der nächsten 24 Stunden an und bleiben während der weiteren Entwicklung konstant (40).

Im Blutserum ist das Kupfer hauptsächlich an zwei E i - w e i ß k ö r p e r gebunden, an Ceruloplasmin und an Albumin. Die Bindung an Ceruloplasmin beträgt beim Menschen 96%, bei der Ratte 99%, beim Hund 88% und beim Schwein 58% des Gesamtkupfers (81). Die von Ceruloplasmin gebundenen absoluten Kupfermengen betragen nach EVANS und WIEDERANDERS (39) beim Hund 59, beim Rind 69, beim Schaf 90, bei der Ratte 122 und beim Schwein 120×10^{-6} g/100 ml.

Das Ceruloplasmin ist ein α_2 -Globulin, das 1948 erstmals von HOLMBERG und LAURELL (65) isoliert wurde und wahrscheinlich in der Leber synthetisiert wird (114, 132). Es enthält 8 Kupferatome pro Molekül, und zwar 4 Cu(I)- und 4 Cu(II)-Atome (49). Infolge seines hohen Kupfergehaltes besitzt es in gereinigtem Zustand eine tiefblaue Farbe. Das Molekulargewicht beträgt etwa 150 000. Durch Säulenchromatographie und Stärkegelelektrophorese ist eine Differenzierung in 2-3 verschiedene Ceruloplasminfraktionen gelungen (107).

Die biologische Funktion des Ceruloplasmins wird noch diskutiert. Die schnelle Kupferaufnahme und sein hoher Gehalt an Kupferatomen legen nahe, daß Ceruloplasmin einen Speicherkomplex für Kupfer darstellt (137) und bei der Aufrechterhaltung des Kupferspiegels im Blut (128) und in den Geweben (113) eine Rolle spielt. Für die Speicherfunktion des Ceruloplasmins sprechen auch die Befunde der hepatolentikulären Degeneration des Menschen (WILSON's Disease). Es handelt sich dabei um einen genetisch bedingten Defekt der biogenen Ceruloplasminsynthese (153) mit stark erniedrigtem Ceruloplasminspiegel im Blut (127, 129). Die Folge ist eine pathologische Kupferablagerung in Leber und Gehirn mit Leberzirrhose und degenerativen Veränderungen des ZNS (153).

Eine andere Eigenschaft des Ceruloplasmins ist seine enzymatische Aktivität. Ceruloplasmin hat die Wirkung einer Polyphenoloxidase und vermag Adrenalin und Serotonin zu oxidieren (32). Es katalysiert weiterhin die Oxidation von zweiwertigem Eisen in der Blutbahn (111) und wird deshalb auch als Ferrooxidase bezeichnet.

Neben dem Ceruloplasmin wird im Blut vorliegendes Kupfer noch an die Albuminfraktion gebunden. Dies geht aus Versuchen mit intravenöser Verabreichung von ^{64}Cu hervor, bei welchen der Kupferanteil des Ceruloplasmins konstant blieb, der Albuminfraktion jedoch deutlich anstieg (51).

Die Albuminfraktion ist in der Lage, eine mehr als äquimolare Kupfermenge zu binden (85). Die Bindung ist jedoch lose, so daß naheliegt, daß der albumingebundene Anteil die Transportform des Kupfers darstellt.

Von SARKAR und KRUCK (125) wird noch eine dritte Kupferverbindung im Serum beschrieben. Es handelt sich um Kupfer-aminosäurekomplexe, denen eine mögliche Rolle beim Kupfertransport durch biologische Membranen zugeschrieben wird. Da diese Verbindungen wesentlich kleinere Moleküle darstellen als der Albuminkomplex, können sie Membranen leichter passieren.

In den roten Blutkörperchen liegen etwa 60% des Kupfers als Erythrocytin (auch Häemocuprein genannt) vor (117). Es wurde 1938 von MANN und KEILIN entdeckt (91). Da das Erythrocytin ein Molekulargewicht von einem Viertel des Ceruloplasmins aufweist, ist es möglicherweise durch Aufspaltung desselben entstanden (69). Bei den einzelnen Tierarten wird der Kupfergehalt der Erythrozyten von EVANS und WIEDERANDERS (39) wie folgt angegeben: Hund 82, Rind 81, Schaf 82, Ratte 96 und Schwein 89×10^{-6} g pro 100 ml Blut.

Die Verteilung des Kupfers auf die verschiedenen Komponenten des Blutes geht nach OWEN (113) folgendermaßen vor sich:

Nach intravenöser Injektion von radioaktivem Kupfer in Form von Kupferacetat bei der Ratte findet sich im Plasma zunächst nur freies ^{64}Cu . Erst nach 15 - 30 Minuten sind Spuren von radioaktivem Kupfer im Ceruloplasmin nachweisbar. Etwa 6 Stunden post injectionem ist die Hälfte des ^{64}Cu an das Ceruloplasmin gebunden. Dieser Anteil erhöht sich von der 39. Stunde bis zum 7. Tag auf durchschnittlich 98,4%.

Beim Menschen ist 5 - 10 Minuten nach der Injektion von radioaktivem Kupfer eine rasche Aufnahme in die Erythrozyten festzustellen, danach vermindert sich die Aktivität

in den roten Blutkörperchen. Nach einer Stunde ist ein erneuter Anstieg des ^{64}Cu zu erkennen, der langsamer abläuft als der erste und ein Maximum in 18 - 20 Stunden erreicht (109).

Diese beiden Versuche lassen vermuten, daß das in der Blutbahn befindliche Kupfer zuerst lose an Albumin gebunden, dann in die Erythrozyten aufgenommen und erst zum Schluß in das Ceruloplasmin inkorporiert wird.

3.3.3. Speicherung

Die Leber ist das H a u p t s p e i c h e r o r g a n für Kupfer. Aus Leberzellen lassen sich zwei Kupferverbindungen isolieren: Hepatocuprein, das sich im Hyaloplasma findet (121) und ähnlich wie das Erythrocuprein einen Kupfergehalt von 0,34% aufweist (117) und das Neonatal Hepatic Mitochondrocuprein, das nur in den Lebern von Neugeborenen vorkommt. Es hat einen außerordentlich hohen Kupfergehalt und soll eine Art Speicherfunktion für Kupfer bei Neugeborenen haben (117).

Der K u p f e r g e h a l t der Leber ist von verschiedenen Faktoren abhängig, vor allem von der Ernährung, dem Alter, der Rasse und der Tierart.

Eine große Bedeutung hat der Kupfergehalt des Futters. Dies gilt allerdings nicht für Feten, da Versuche von CUNNINGHAM (29) zeigten, daß neugeborene Ferkel von qualitativ und quantitativ gleich ernährten Sauen, Kupferkonzentrationen zwischen 38,8 und 485,7 ppm i.T. der Leber haben können.

Die Relation zwischen Alter und Kupferkonzentration der Leber läßt sich dahingehend zusammenfassen, daß neugeborene und juvenile Individuen derselben Species in der Regel höhere Werte aufweisen als erwachsene. Dies könnte mit einer altersabhängigen Resorptionsquote zusammenhängen, da z.B. beobachtet wurde, daß ein 1 1/2 Monate altes Kalb

7%, ein 1 1/2 Jahre alter Bulle dagegen nur 1% einer oral verabreichten Dosis radioaktiven Kupfers in der Leber speicherte (27). Beim Schaf scheint die eben genannte Regel allerdings durchbrochen zu sein, da PRYOR (118) feststellen konnte, daß Schaffeten mit durchschnittlich 124 ppm i.T. deutlich weniger Kupfer in der Leber aufweisen als deren Mütter mit 245 ppm i.T.

Rassespezifische Unterschiede der Kupferkonzentrationen der Leber lassen sich von Untersuchungen ableiten, die zeigen, daß Texelschafe höhere Gehalte haben als Milchschafe und Schwarzköpfe (88).

Auch tierartliche Unterschiede wurden von KÜHNERT (78) ermittelt, der in frischen Lebern verschiedener Species folgende Konzentrationen fand: Schwein 20 - 30, Hund 20 - 40, Rind 20 - 60, Kalb 60 - 120 und Schaf 60 - 80 ppm. Die durchschnittliche Kupferkonzentration der Rattenleber wird von SZÖKE und ZEMPLEIN (140) mit 6,6 ppm im Frischgewebe angegeben.

Der Einbau des Kupfers in die Leberzelle erfolgt auf zwei Wegen:

Bei den reticuloendothelialen Elementen überwiegt die Phagocytose. Dabei gelangen größere Kupferpartikel durch Membranvakuolisierung in die Zelle. Bei den Parenchymzellen steht die Pinocytose ganz im Vordergrund. Eine diffuse Inkorporation von molekular verteiltem Kupfer in der Zelle, läßt sich nicht nachweisen (160, 161). Die Aufnahme des Kupfers wird unter dem Einfluß von Aminosäuren gefördert (61). Da für diesen Transport Sauerstoff benötigt wird, vermuten die Untersucher, daß es sich um einen aktiven Prozeß handelt. Aus dem Blut gelangt Kupfer schnell in die Leber. Bei Ratten, denen radioaktives Kupfer intravenös appliziert wird, ist nämlich ein Aktivitätsgipfel (30% der verabreichten Dosis) in der Leber bereits nach 30 Minuten festzustellen (62).

Die Speicherung des in die Leberzelle eingeschleusten Kupfers erfolgt hauptsächlich in den Lysosomen

(19, 53, 54, 100, 151, 165). Dabei wird das Kupfer unmittelbar in die Lysosomen aufgenommen oder die Kupferpartikel werden von einer Membran umgeben und formen sich durch Einlagerung einer Grundsubstanz in Lysosomen um (160, 161). Gelegentlich wird auch von einer intrazellulären Verteilung des Kupfers auf Mitochondrien und Nuclei berichtet (79).

3.3.4. Ausscheidung

Kupfer wird auf drei Wegen aus dem Organismus ausgeschieden, über die Leber via Galle, die Nieren und die Darmschleimhaut.

Die Hauptausscheidung erfolgt über die Leber mit der Galle. Dieser Eliminationsweg spielt bei Ratten (105, 112), bei Hunden (90), bei Mäusen (51) und auch beim Menschen (24) die größte Rolle. Weniger bedeutend ist die Ausscheidung direkt über die Darmschleimhaut. Sie beträgt beim Menschen etwa 20% (24), während beim Kaninchen die Darmschleimhaut das wichtigste Kupferausscheidungsorgan sein soll (86). Bei oraler Verabreichung wird sehr wenig Kupfer über die Nieren eliminiert. Der Anteil beträgt z.B. beim Schwein nur 2 - 3% (74), beim Menschen sogar weniger als 1% (24). Nach der intravenösen Injektion von Kupfer wird dagegen eine deutliche renale Ausscheidung beobachtet (108). Das auf diese Weise eliminierte Kupfer soll als Albuminkomplex vorliegen (98, 108). Die Art der Applikation ist also von großer Bedeutung für die Ausscheidung. Nach COMAR et al. (27) verhält sich z.B. die Kupferexkretion von Rindern nach oraler Applikation über Kot und Harn wie 25:1, während dieses Verhältnis nach intravenöser Kupferinjektion bei 1:1 liegt.

Die angegebenen Ausscheidungswege werden von verschiedenen Substanzen beeinflusst. Zum Beispiel scheiden Schafe nach Anreicherung der Nahrung mit Molybdän und Sulfat wesentlich mehr Kupfer über die Nieren aus als nach der Aufnahme eines normal supplementierten Futters (92). Auch Neben-

nierenhormone scheinen für die Kupferausscheidung von Wichtigkeit, da nach Adrenalektomie bei Ratten die biliäre Kupferexkretion stark vermindert ist (42).

3.4. Klinisches Vergiftungsbild

Die klinischen Vergiftungssymptome der chronischen Kupfervergiftung beginnen mit plötzlicher Futterverweigerung. Im weiteren Verlauf werden die Tiere zunehmend schwächer und kommen in völlig apathischen Zustand zum Festliegen. Sie zeigen anfallsweise krampfartige Zuckungen der gesamten Muskulatur und schreien immer wieder auf. Die sichtbaren Schleimhäute verfärben sich gelbbraun. Die Körpertemperatur ist normal, die Atmungs- und Herzfrequenz stark erhöht. Nach einer Krankheitsdauer von durchschnittlich 2 Tagen verenden die Tiere unter auffallender Atemnot. Gelegentlich werden auch plötzliche Todesfälle ohne vorangegangene klinische Symptome beobachtet. Vereinzelt können Tiere Krankheitserscheinungen über mehrere Wochen zeigen. Während dieser Zeit kann der Krankheitszustand wechseln; die Tiere magern aber kontinuierlich ab und überleben in den seltensten Fällen (9, 11, 155).

Das Vergiftungsbild ist durch folgende klinisch-chemische Veränderungen gekennzeichnet:

Dem Ausbruch der akuten Krankheitssymptome geht einige Tage zuvor ein Anstieg der Blutkupferkonzentration voraus, der bis zu 20 ppm erreichen kann (147). Dieses Stadium wird als sog. "hämolytische Krise" bezeichnet, da sich gleichzeitig eine starke Hämolyse entwickelt. Innerhalb von 48 Stunden kann der Hämoglobingehalt bis auf 10 g% absinken. Die bis zum Faktor 10 erhöhten Milchsäure- und Brenztraubensäurekonzentrationen lassen auf eine Gewebsanoxie schließen. Der vielleicht wichtigste Befund ist ein rapider Abfall der Blutglutathionkonzentration, die beim Schaf auf weniger als 10% des Normwertes absinken kann (146).

Diese Werte sind im Hinblick auf den Hämolysemechanismus von großer Bedeutung. Das Gesamtbilirubin im Blutserum steigt 1 - 2 Tage vor Auftreten der ersten klinischen Symptome stark an und erreicht einige Stunden vor dem Exitus einen Höhepunkt. Bei Kälbern werden Werte von 2,64 - 9,72 mg% (normal etwa 0,3 mg%) gemessen. Dieser Anstieg resultiert teils aus den Leberzellschädigungen, teils aus dem vermehrten Blutabbau. Die Bilirubinerhöhung kann als frühestes sicheres Zeichen einer bevorstehenden hämolytischen Krise gelten (155). Auf dem Höhepunkt der Krankheit sind das Serumkupfer und das Serumeisen stark vermehrt. Der Serumkupfergehalt liegt bei Kälbern bei 4,5 - 16,5 ppm (9, 155), bei Schafen bei 5 - 20 ppm (147), in besonderen Fällen sogar bei 25 ppm (139). Die Erhöhung des Serumeisens ist wahrscheinlich auf die Abgabe des Eisens aus den zerstörten Leberzellen zurückzuführen (155). Das freigewordene Hämoglobin wird in zunehmenden Maße zu Hämglobin umgewandelt, so daß beim Kalb kurz vor dem Tode Hämglobinwerte bis zu 60% gefunden werden. Das Blutserum weist dabei eine zunehmend braune Färbung auf (144, 155).

Beim Schaf lassen die Enzymbestimmungen von TODD und THOMPSON (146) vermuten, daß eine Leberschädigung 6 - 8 Wochen vor der hämolytischen Krise einsetzt. MACPHERSON und HEMINGWAY (89) halten nur die SGOT-Werte für geeignet bei der Frühdiagnose der chronischen Kupfervergiftung der Schafe. Erhöhte SGOT-Aktivitäten werden schon 1 - 6 Wochen vor dem Auftreten klinischer Symptome gefunden. Bei Lämmern beobachtet ROSS (120) etwa 4 Wochen vor dem Tod der Tiere schnell anwachsende GOT-Werte im Plasma. Beim Kalb bestimmen TODD und THOMPSON (148) eine Woche vor Beginn der Krankheitserscheinungen gesteigerte SGOT- und LDH-Aktivitäten, während BAUR (9) zu diesem Zeitpunkt keine Enzymveränderungen feststellt. Erst wenn die Erkrankung klinisch manifest wird, steigen bei seinen Untersuchungen SGOT, LDH und alkalische Phosphatase an. SGPT zeigt einen

langsameren und späteren Anstieg, der aber nicht die sehr hohen SGOT- und LDH-Werte kurz vor dem Exitus erreicht.

3.5. Pathologisch-anatomisches Vergiftungsbild

Das pathologisch-anatomische Vergiftungsbild der chronischen Kupfervergiftung wird bei Schafen und Kälbern wie folgt beschrieben: Bei der Sektion fällt besonders eine gelb- bis schmutzigbraune Verfärbung des Tierkörpers auf, die vor allem in den wenig pigmentierten Geweben wie Unterhaut, Netz, Knorpel und Aortenintima zu sehen ist. Die Leber ist meist leicht geschwollen, von mäßig derber Konsistenz und gelbbraunrot gefärbt. Manchmal weist sie auch eine fleckig rote Färbung auf. Die Leberschnittfläche läßt eine landkartenartige Felderung erkennen. Die Nieren sind dunkelbraunrot verfärbt und zeigen eine deutliche Streifung an der Schnittfläche. In der Labmagenschleimhaut finden sich multiple Petechien und Ekchymosen. Regelmäßig wird über subepicardiale und subendocardiale Blutungen am Herzen, seltener über subpleurale Blutungen in der Brustwand berichtet (9, 11, 139, 155).

Beim Schwein werden Lebernekrosen, generalisierter Ikterus, Nierenschädigungen und Ulzerationen bzw. Hämorrhagien der Magenschleimhaut beschrieben (21, 55). Bei experimenteller chronischer Kupfervergiftung von Hühnern stehen Läsionen des Intestinaltraktes im Vordergrund. Die Leber ist nicht betroffen (20).

Die histologischen Untersuchungen zeigen das Bild einer subakuten Leberdystrophie oder das einer Leberzirrhose mit akuter Zellnekrose. Die toxische Dystrophie ist gekennzeichnet durch Vakuolisierung und fettige Degeneration des Zytoplasmas, sowie durch Kernwandhyperchromasie, Pyknose und Karyorhexis. Außerdem werden Dissoziation und Desquamation der Leberzellen und in geringerem Maße peribiliäre und intralobuläre Fibrosen

im Bereich von Gallengangsproliferationen beobachtet. Die Leberzirrhose führt zu starker Vermehrung der kollagenen Fasern im Bereich der GLISSON'schen Dreiecke. Von dort ziehen die kollagenen Fasern nicht selten in die intra-lobulären Gebiete (9, 23, 155). Histologische Veränderungen des Lebergewebes bei Schafen beschreiben ISHMAEL et al. (66) bereits 6 Wochen vor der hämolytischen Krise. Zu diesem Zeitpunkt lassen sich Nekrose von isolierten Parenchymzellen und vereinzelt Schwellung von kupferhaltigen KUPFFER'schen Sternzellen erkennen. Bei später vorgenommenen Leberbiopsien verstärkt sich die Zellnekrose. Viele Parenchymzellen zeigen fettige Degeneration, Karyomegalie und Kernvakuolisierung. Im Stadium der hämolytischen Krise sind ausgedehnte Herdnekrosen des Lebergewebes festzustellen. An den Nieren zeigen die proximalen Tubuli Degenerationserscheinungen, die eine akute Glomerulo- und Tubulonephrose darstellen. Auffallend ist die "Verleimung" der Glomerulumschlingen und das Auftreten von Eiweißkopazervaten in den BOWMAN'schen Räumen und in den Tubuluslichtungen (9, 155).

H i s t o c h e m i s c h lassen sich hauptsächlich in den Leberzellen, in den KUPFFER'schen Sternzellen und in den Kapillarendothelien des Gehirns zahlreiche Kupfergranula nachweisen (155).

C h e m i s c h werden in den Lebern von Kälbern stets über 1000 ppm Kupfer i.T. gefunden. Kupferwerte über 700 ppm sind verdächtig, solche über 900 ppm weisen eindeutig auf eine chronische Kupfervergiftung hin (155). Beim Schaf ist bereits ein Kupfergehalt von über 500 ppm i.T. ein sicheres Anzeichen für die Intoxikation (11). In Einzelfällen sind bis zu 4400 ppm i.T. der Leber von Kälbern (9) und bis zu 4000 ppm i.T. bei Schafen (104) nachgewiesen worden. Von einem tödlichen Fall bei Schweinen mit einer Leberkupferkonzentration von 2500 ppm i.T. berichten GORDON und LUKE (55).

3.6. Pathogenese

Im Vordergrund aller Überlegungen zur Pathogenese der chronischen Kupfervergiftung der Wiederkäuer steht der unbekannte Auslösemechanismus bei der hämolytischen Krise. Die folgende Hypothese stellt ein Gedankenmodell für den möglichen Ablauf der Vergiftung dar:

Die kontinuierliche Aufnahme erhöhter Kupfermengen führt zu einer starken Speicherung des Kupfers in den Lysosomen der Leberzellen. Das in den Lysosomen inkorporierte Kupfer labilisiert die Lysosomenmembran durch Lipidperoxidation. Dadurch können lysosomale Enzyme in das Cytoplasma gelangen und aufgrund ihrer stark autolytischen Wirkung binnen kurzem zu einer akuten Leberdystrophie mit massiven Zellnekrosen führen.

Durch die gesteigerte Membranpermeabilität der Lysosomen wird auch das gespeicherte Kupfer frei. Die Kupferkonzentration im Blut steigt an. Hinzu kommt ein Konzentrationsanstieg des reaktionsfähigen, nicht an Ceruloplasmin gebundenen Kupfers im Serum, da die Biosynthese des Speicherkomplexes durch die Leberläsionen beeinträchtigt ist. Große Bedeutung hat weiterhin der starke Abfall des Glutathiongehaltes im Blut. Die Folge ist eine Schädigung der Erythrozytenmembran. In gleicher Richtung wirken die freigewordenen lysosomalen Enzyme, so daß sich schließlich eine Hämoglobinämie entwickelt. Das freie Hämoglobin wird durch die Kupfer(II)-Ionen progressiv zu Hämiglobin oxidiert.

Diese Vorstellungen sollen anhand der Literatur untermauert werden:

Die sauren Hydrolasen werden unter physiologischen Bedingungen durch die Lipoproteinmembran der Lysosomen am Übertritt in das Cytoplasma gehindert.

Die Labilisierung der lysosomalen Membran wird vermutlich durch Kupfer selbst verursacht. Versuchsergebnisse von LINDQUIST (83) zeigen,

daß Kupfer eine Lipidperoxidation, d.h. Schädigung der Lysosomenmembran bewirken kann. Weitere Versuche ergaben, daß die Kupferspeicherung in der Leber zu einer erhöhten Aktivität saurer Hydrolasen, zum Beispiel von Kathepsin, Sulphatase und saurer Phosphatase führt (84). Dieser Prozeß beginnt sich schon 6 - 8 Wochen vor Beginn der hämolytischen Krise zu entwickeln (66).

Die s a u r e n H y d r o l a s e n vermögen biologische Materialien bis zu niedermolekularen Bruchstücken abzubauen. Die Lysosomen werden deshalb auch als Zentren der intrazellulären Verdauung angesehen (133). Die rasche, postmortale Autolyse von Leber, Nieren und Milz erklärt sich aus dem hohen Gehalt an Lysosomen (102). Unverdauliche Substanzen, zum Beispiel Schwermetalle werden von den Lysosomen abgekapselt (19).

Auf den Abfall des G l u t a t h i o n g e h a l t e s zu Beginn der hämolytischen Krise wurde bereits hingewiesen (s. S.16).

Nur auf eine einzelne Beobachtung aus dem Jahre 1883 gestützt, ist allerdings die Annahme einer d i r e k t e n H ä m i g l o b i n b i l d u n g durch Kupfer (37). Diese ist jedoch unter anderem Gegenstand der eigenen Untersuchungen.

Noch weitgehend ungeklärt ist die Rolle des S t r e s s ' beim Zustandekommen der hämolytischen Krise. Von vielen Autoren wird ihm eine große Bedeutung zugeschrieben.

Beim Schaf werden ganz allgemeine Belastungszustände wie Trächtigkeit, Ablammen, Laktation, Schur oder unzureichende Ernährung als auslösende Faktoren angegeben (26, 58). Vor allem aus Australien wird berichtet, daß Transport, plötzliche Futterumstellungen, aber auch starke Temperaturschwankungen häufig den Anstoß zur Entwicklung der klinischen Vergiftungserscheinungen geben (1, 116).

Bei Kälbern tritt nach den Beobachtungen von SHAND und LEWIS (131) die hämolytische Krise immer um die Zeit des Wechsels von Milchaustauschern auf Rauhfutter auf. Der erwähnte Transportstreß würde auch die Tatsache erklären, daß zur Schlachtung immer wieder Kälber mit Ikterus angeliefert werden, die als nachweislich gesunde Tiere zur Verladung gekommen sind (9).

Interessanterweise steigt unter der Einwirkung von Stressoren der Blutkupferspiegel stark an. Dies zeigten zum Beispiel Ratten, welche ein bis zwei Stunden lang bei Temperaturen von 40 - 43°C gehalten waren (4). Ihr Blutkupfergehalt erhöhte sich nach einer Stunde von 118 auf 256,4 $\times 10^{-6}$ g/100 ml und nach zwei Stunden auf 354 $\times 10^{-6}$ g/100 ml, während gleichzeitig die Organkupferkonzentrationen abnahmen. Signifikant höhere Blutkupferkonzentrationen beobachteten auch EVANS und WIEDERANDERS (41), welche bei Ratten einen intensiven Streß durch Schwimmen erzeugten.

Die Veränderung des Blutkupfergehaltes hängt möglicherweise mit einem hormonell bedingten Stabilitätsverlust der Speicherorganellen (Lysosomen) zusammen. Unter dem Einfluß von Stressoren werden u.a. Nebennierenrindenhormone freigesetzt, welche ebenso wie viele andere Steroide, zum Beispiel Östradiol, Progesteron, Pregnanolon, als "potent labilizers" der lysosomalen Membran bekannt sind (156, 157, 158).

Es ist also denkbar, daß dem Streß Bedeutung bei der Auslösung der hämolytischen Krise zukommt und daß Stressoren die labilisierenden Vorgänge der Lysosomenmembran beschleunigen können.

3.7. Therapiemaßnahmen

Die Behandlung der chronischen Kupfervergiftung ist wegen der irreversiblen Leberschäden selten erfolgreich. Neben einer Leberschutztherapie und einer Unterstützung

des Kreislaufs wird häufig die orale Verabreichung von EDTA (Äthylendiamintetraessigsäure), BAL (2,3-Dithiopropäno1) und D-Penicillamin (2,2-Dimethylcystein) empfohlen. EDTA führt durch Bildung eines harnfähigen Kupferchelats zu einer beschleunigten renalen Ausscheidung, während der Wirkungsmechanismus der Thiole auf der Kupferbindung durch die SH-Gruppen beruht. D-Penicillamin gilt als Mittel der Wahl bei der Behandlung der WILSON disease (10).

Die progressive Hämoglobinbildung kann durch Redoxfarbstoffe wie Methylenblau beeinflusst werden, da sie die NADP-abhängige Hämoglobinreduktion intensiv aktivieren (5).

Prophylaktisch empfehlen ROSS (120) und BARDEN und ROBERTSON (7) die Verabreichung von Ammoniummolybdat und Natriumsulfat zur Verhinderung der toxischen Anreicherung des Kupfers in der Leber. Diese Substanzen hemmen die Kupferresorption bzw. steigern die Kupferausscheidung durch den Darm.

3.8. Offene Probleme

Aus den vorstehenden Ausführungen über die chronische Kupfervergiftung ergibt sich, daß als unmittelbare Ursache für den tödlichen Verlauf der hämolytischen Krise eine innere Erstickung als Folge der starken Hämoglobinbildung am wahrscheinlichsten ist, da der Tod mit allen Anzeichen einer akuten Dyspnoe bei einem Hämoglobingehalt von 60% und mehr eintritt. Es liegt nahe, eine Verbesserung der Therapiechancen in erster Linie durch Beseitigung der unmittelbaren Todesursache anzustreben. Dazu ist es erforderlich, das Zustandekommen der Hämoglobinbildung zu kennen oder ggf. zu untersuchen. Bislang ist über Hämoglobin und Hämoglobinämien folgendes bekannt:

4. Hämoglobinbildung und Hb(III)-Bildner

H ä m i g l o b i n (auch Ferrihämoglobin : Hb(III), Methämoglobin : Met-Hb) unterscheidet sich von Hämoglobin durch die Oxidationsstufe des Eisens. Es enthält dreiwertiges Ferrieisen im Gegensatz zum zweiwertigen Ferroeisen im Hämoglobinmolekül und kann keinen molekularen Sauerstoff binden, bzw. transportieren.

Hämoglobin hat bei einem pH-Wert von weniger als 8,5 - also zum Beispiel in vivo - eine charakteristische braune Farbe und besitzt spektrophotometrisch zwei Absorptionsbanden bei etwa 500 und 630 nm. Bei höheren pH-Werten als 8,5 schlägt die braune Farbe mehr oder weniger nach Rot um mit Absorptionsbanden bei 540 und 577 nm. Hämoglobin weist demnach im Gegensatz zu Hämoglobin Indikatoreigenschaften auf (5).

In vivo entsteht Hb(III) spontan durch Autoxidation. Diese würde im Verlauf von wenigen Tagen mit einem Hb(III)-Gehalt von 40 - 50% des Gesamthämoglobins zu einem Fließgleichgewicht mit den Redoxsubstanzen des Plasmas führen (45, 67), wenn nicht enzymatische Mechanismen in den Erythrozyten eine physiologische Hb(III)-Konzentration von weniger als 1% aufrechterhalten würden (5). In gealterten Erythrozyten können Konzentrationen von 8 - 10% vorkommen (5).

Die e n z y m a t i s c h e R e d u k t i o n des autoxidativ gebildeten Hämiglobins beruht im wesentlichen auf zwei Vorgängen im Rahmen der Glykolyse, welche beide letzten Endes NADH liefern:

Der bedeutsamste Schritt ist die Oxidation von 3-Phosphoglycerinaldehyd zu 1,3-Diphosphoglycerat unter Einbau von anorganischem Phosphat. Diese Reaktion wird durch die Phosphotriosedehydrogenase katalysiert. Als Coenzym fungiert NAD, welches zu NADH reduziert wird.

Eine zweite Möglichkeit ist die Dehydrierung von Lactat zu Pyruvat unter Katalyse durch die Lactatdehydrogenase, welche ebenfalls NAD als Coenzym benötigt (5, 14).

Das bei beiden Reaktionen anfallende NADH kann Hämoglobin nicht direkt reduzieren. Die Elektronenübertragung von NADH auf Hb(III) erfolgt durch ein Flavinenzym, die NADH-abhängige Methämoglobinreductase, welche auch als Diaphorase bekannt ist (5, 14). Nach SCOTT et al. (130) existiert neben diesem die Hauptaktivität repräsentierenden Ferment noch eine NADH-Methämoglobinreductase II.

Eine therapeutisch nutzbare Hämoglobinreduktion ist mit Redoxfarbstoffen, zum Beispiel Methylenblau, Thionin, Toluidinblau und Toluylenblau möglich. Diese Farbstoffe werden durch die NADPH_2 -abhängige Methämoglobinreductase in die Leucoform übergeführt und reduzieren ihrerseits Hb(III) zu Hb(II). Diese Reaktion verläuft etwa 10 mal schneller als die obenerwähnte Reduktion über den EMBDEN-MEYERHOF-Weg und gleichfalls schneller als eine mit dem Pentose-Phosphat-Zyklus zusammenhängende direkte Reduktion durch die Methämoglobinreductase selbst (5, 14).

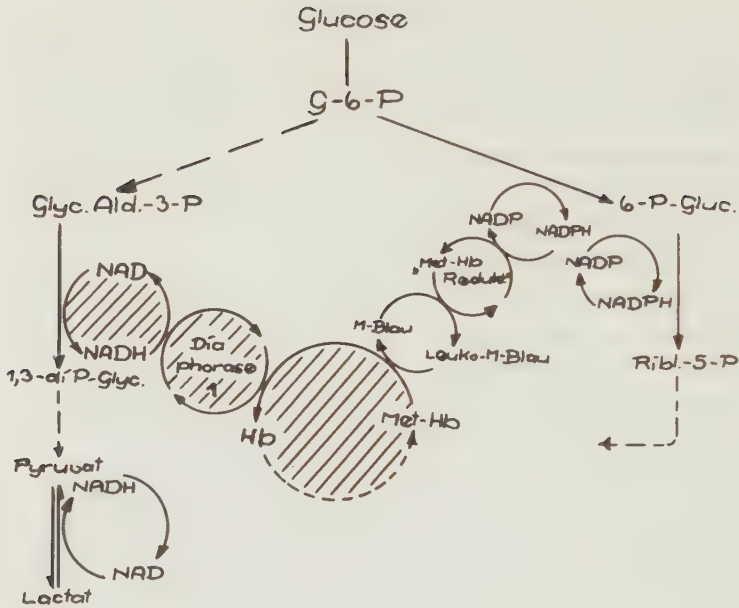


Abb. 1: Schema der intrazellulären Hämoglobinreduktion
Links: EMBDEN-MEYERHOF-WEG
Rechts: Ausnutzung des Pentose-Phosphat-Zyklus
mittels Methylenblau (nach BETKE: 14)

Der Mechanismus der Hb(III)-Rückbildung weist artspezifische Unterschiede auf, da zum Beispiel Mäuse und Kaninchen eine höhere Aktivität der NADH-abhängigen Methämoglobinreductase zeigen als Hunde, Katzen und Menschen (138).

Hämoglobinämien stellen Störungen des Gleichgewichtes zwischen spontaner Oxidation des Hämoglobins und enzymatischer Reduktion des Hämoglobins dar.

Sie werden neben endogenen Faktoren durch zahlreiche Fremdstoffe verursacht. Diese Substanzen werden entsprechend ihrem Wirkungsmechanismus in zwei Gruppen unterteilt:

Hb(III)-Bildner, welche in direkter Oxidation mit dem Hämoglobin reagieren und dabei selbst reduziert werden. Zu ihnen gehören neben Ferricyanid und Chlorat besonders Redoxsubstanzen wie einige Chinone und Chinonimine sowie die bereits angeführten Redoxfarbstoffe in hoher Dosierung. Diese Verbindungen werden jeweils nach Reduktion durch Hämoglobin durch Sauerstoff wieder oxidiert, so daß sie die Hämoglobinbildung stark katalysieren.

Von größerer Wichtigkeit sind Substanzen, welche über eine gekoppelte Oxidation zu Hämoglobin führen. Es handelt sich dabei fast ausschließlich um Reduktionsmittel, welche in Reaktion mit dem Sauerstoff des Hämoglobins treten. Bei diesem Vorgang entsteht intermediär Wasserstoffperoxid, welches seinerseits Hämoglobin oxidiert. Solche Hb(III)-Bildner sind unter anderen Arsenwasserstoff, Hydroxylamid und auch das Nitrit (5).

Auf welche Weise die Hämoglobinbildung bei der chronischen Kupfervergiftung zustande kommt, ist beim derzeitigen Stand des Wissens offen. Es liegt nahe, daß das Schwermetall dabei selbst eine entscheidende Rolle spielt, zumal es bekanntlich Redoxeigenschaften besitzt. Weitere Aufschlüsse hierzu sollen die folgenden Untersuchungen liefern.

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Als Beitrag zur Kenntnis der Hämoglobinbildung bei der hämolytischen Krise der chronischen Kupfervergiftung wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- Wird Hämoglobin in Gegenwart von Cu^{++} zu Hämoglobin oxidiert?
- Ist die Hämoglobinbildung Cu^{++} -spezifisch?
- Wie ist die Kinetik dieser Reaktion?
- Bestehen tierartliche Unterschiede bei einer Cu^{++} -spezifischen Hämoglobinbildung?
- Welche Rolle spielt die Erythrozytenmembran bei der Hämoglobinbildung durch Cu^{++} ?
- Ist der Einfluß der Erythrozytenmembran auf die Hämoglobinbildung tierartlich verschieden?
- Welche Bedeutung hat das Plasma für die Cu^{++} -spezifische Hämoglobinbildung?

1. Hämoglobinbildung durch Kupfer(II)-acetat

Zur Untersuchung der ersten Fragestellung wurden folgende Versuchsbedingungen gewählt:

1.1. Reagenzien

- a) Heparinlösung, 1,5%ig in aqua dest., hergestellt aus Heparin sodium USP XV, 146 000 IE/g, SCHUCHARDT, München
- b) Inactin[®] (Natriumsalz des Äthyl-(1-methylpropyl)-malonylthioharnstoffs), PROMONTA, Hamburg
- c) Kupferacetatlösung, $503,6 \times 10^{-5}$ molar, hergestellt aus aqua dest. und $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Cu} \cdot \text{H}_2\text{O}$ p.a., MERCK, Darmstadt

d) Natriumacetatlösung, $503,6 \times 10^{-5}$ molar, hergestellt aus aqua dest. und $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ p.a., MERCK, Darmstadt.

1.2. Versuchstiere

6 männliche Sprague Dawley-Ratten mit einem Gewicht von $315 \pm 25,9 \text{ g } (\bar{x} \pm s_x)$.*

1.3. Gewinnung und Gerinnungshemmung des Blutes

Das Blut der Versuchstiere wurde in Allgemeinanästhesie (100 mg Inactin® pro kg Körpergewicht i.p. in 5%iger Lösung) aus der A.carotis gewonnen und in einem Reagenzglas mit Heparinlösung (0,2 ml ad 5,0 ml Blut) gemischt.

1.4. Hämolyse

Zur Hämolysierung des Blutes wurde dieses 1/11 mit aqua dest. verdünnt und 20 Minuten lang bei $37,5^\circ\text{C}$ im Wasserbad inkubiert (Hämolyseblut).

1.5. Versuchsansätze

Je 9 Volumenteile Hämolyseblut jeder Ratte wurden mit 1 Volumenteil Kupferacetat- (= Kupferacetatansatz) bzw. Natriumacetatlösung (= Natriumacetatansatz) gemischt, 60 Minuten lang bei $37,5^\circ\text{C}$ im Wasserbad gehalten und anschließend 5 Minuten lang bei 5000 U/min zentrifugiert.

1.6. Extinktionsermittlung

Zur Bestimmung einer Hämoglobinbildung in den Versuchsansätzen wurde die spezifische Hb(III)-Extinktion bei 626 nm (E_{626}) mit dem ZEISS-Spektralphotometer PMQ II unter Verwendung von Glasküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm bestimmt.

* $\bar{x}$: arithmetischer Mittelwert

s_x : Standardabweichung des Einzelwertes

Unter diesen Bedingungen wurden folgende Ergebnisse erhalten:

Tab. 1: E_{626} -Entwicklung durch Kupfer(II)-acetat und Natriumacetat

Statistische Parameter	Natriumacetat-ansatz	Kupfer(II)-acetat-ansatz
n^*	6	6
$\bar{x}$	0,230	0,933
$s_{\bar{x}}^*$	$\pm 0,025$	$\pm 0,013$

Die Hämoglobinbildung in beiden Ansätzen läßt sich durch folgende Graphik veranschaulichen:

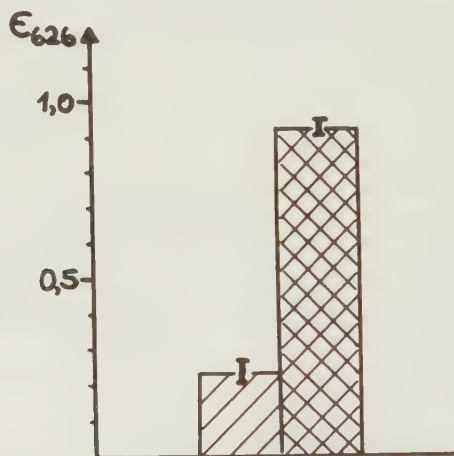


Abb. 2: E_{626} -Entwicklung ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) durch Kupfer(II)-acetat (▨) und Natriumacetat (▧)

* n : Anzahl der Meßwerte

$s_{\bar{x}}$: Standardabweichung des Mittelwertes

Aus Tabelle 1 und aus Abbildung 2 geht hervor, daß Kupfer(II)-Ionen die Extinktion von hämolysiertem Rattenblut bei 626 nm etwa um den Faktor 4 erhöhen. Diese Erhöhung ist mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 0,1% statistisch signifikant (t-Test).

2. Kinetik der Hämoglobinbildung durch Kupfer

Im zweiten Versuch wurde die Kinetik der Hämoglobinbildung durch Kupfer(II)-Ionen geprüft.

Die Versuchsbedingungen entsprachen denen von Versuch 1, mit dem Unterschied, daß die Extinktionsermittlung nach 5, 20, 35, 65 und 125 Minuten erfolgte.

Die Meßergebnisse sind in Tabelle 2 enthalten und in Abbildung 3 graphisch dargestellt:

Tab. 2: Extinktion der Versuchsansätze bei 626 nm in Abhängigkeit von der Zeit

Zeit (min)	Statistische Parameter	$[\text{Cu(II)}]^* \times 10^{-5}$	$[\text{Na}] \times 10^{-5}$
		50,36	50,36
5	n	6	6
	$\bar{x}$	0,483	0,223
	$s_{\bar{x}}$	$\pm 0,024$	$\pm 0,022$
20	n	6	6
	$\bar{x}$	0,652	0,222
	$s_{\bar{x}}$	$\pm 0,033$	$\pm 0,024$
35	n	6	6
	$\bar{x}$	0,752	0,220
	$s_{\bar{x}}$	$\pm 0,031$	$\pm 0,023$
65	n	6	6
	$\bar{x}$	0,933	0,230
	$s_{\bar{x}}$	$\pm 0,013$	$\pm 0,025$
125	n	6	6
	$\bar{x}$	1,201	0,249
	$s_{\bar{x}}$	$\pm 0,035$	$\pm 0,034$

*[]: als molare Konzentration

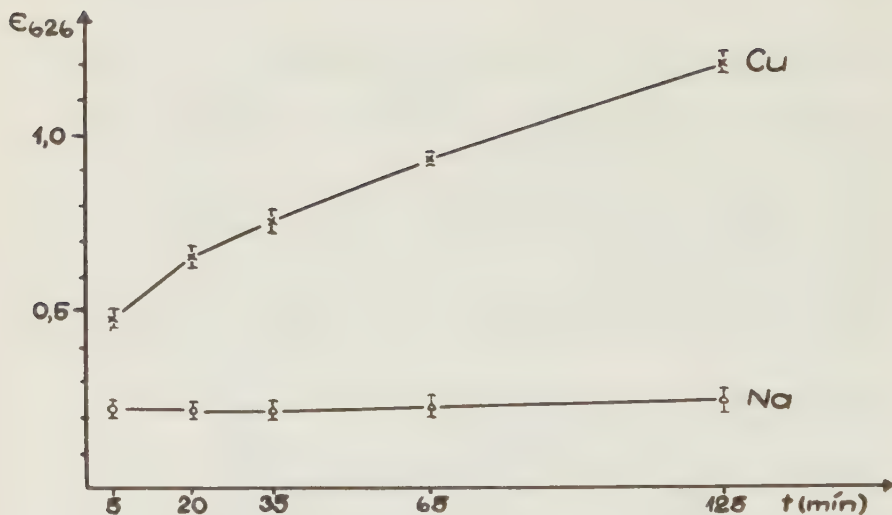


Abb. 3: E_{626} -Entwicklung ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) durch Kupfer(II)-acetat und Natriumacetat als Funktion der Zeit

Der zweite Versuch läßt erkennen, daß die Extinktion des Kupfer(II)-acetatansatzes in Abhängigkeit von der Zeit ansteigt, während der Natriumacetatansatz zwei Stunden lang im Bereich des Ausgangswertes bleibt. Die Extinktionsdifferenz beider Ansätze ist mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 0,1% signifikant (t-Test).

3. Hämoglobinbildung als Funktion der Kupfer(II)-
Konzentration

Als nächste Frage wurde untersucht, ob die Extinktionsentwicklung eine Abhängigkeit von der Kupferkonzentration zeigt und damit kupferspezifisch ist.

Hierzu wurden 6 männliche Sprague Dawley-Ratten mit einem Gewicht von $346,7 \pm 28,1$ g ($\bar{x} \pm s_x$) verwendet. Ihr Hämolyseblut wurde bei Kupfer- bzw. Natriumkonzentrationen von $0,78 \times 10^{-5}$ bis $50,36 \times 10^{-5}$ molar exponiert. Die Kupferkonzentration in den Ansätzen betrug also 0,5 - 32 ppm und lag damit in einer Größenordnung wie sie auch bei der hämolytischen Krise der Wiederkäuer beobachtet wird. Die Inkubationszeit war 60 Minuten; alle übrigen Bedingungen wurden beibehalten.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefaßt:

Tab. 3: Extinktion von hämolysiertem Rattenblut bei 626 nm als Funktion der Cu(II)- und Na-acetat-konzentration

[Cu(II)] bzw. [Na] $\times 10^{-5}$	Statist. Para- meter	E_{626}		ΔE_{626}
		Cu(II)- Ansatz	Na-Ansatz	
0,78	n	6	6	0,019 $\pm 0,008$
	$\bar{x}$	0,211	0,192	
	$s_{\bar{x}}$	$\pm 0,009$	$\pm 0,012$	
1,57	n	6	6	0,037 $\pm 0,009$
	$\bar{x}$	0,233	0,196	
	$s_{\bar{x}}$	$\pm 0,011$	$\pm 0,014$	
3,14	n	6	6	0,067 $\pm 0,007$
	$\bar{x}$	0,260	0,193	
	$s_{\bar{x}}$	$\pm 0,011$	$\pm 0,010$	
6,29	n	6	6	0,169 $\pm 0,017$
	$\bar{x}$	0,361	0,192	
	$s_{\bar{x}}$	$\pm 0,032$	$\pm 0,011$	
12,59	n	6	6	0,263 $\pm 0,015$
	$\bar{x}$	0,454	0,191	
	$s_{\bar{x}}$	$\pm 0,027$	$\pm 0,011$	
25,18	n	6	6	0,450 $\pm 0,017$
	$\bar{x}$	0,640	0,190	
	$s_{\bar{x}}$	$\pm 0,031$	$\pm 0,011$	
50,36	n	6	6	0,719 $\pm 0,015$
	$\bar{x}$	0,911	0,192	
	$s_{\bar{x}}$	$\pm 0,026$	$\pm 0,012$	

Die Meßwerte sind als Extinktionsdifferenzen (ΔE_{626}) zwischen Kupfer- und Natriumansätzen in Abbildung 4 veranschaulicht:

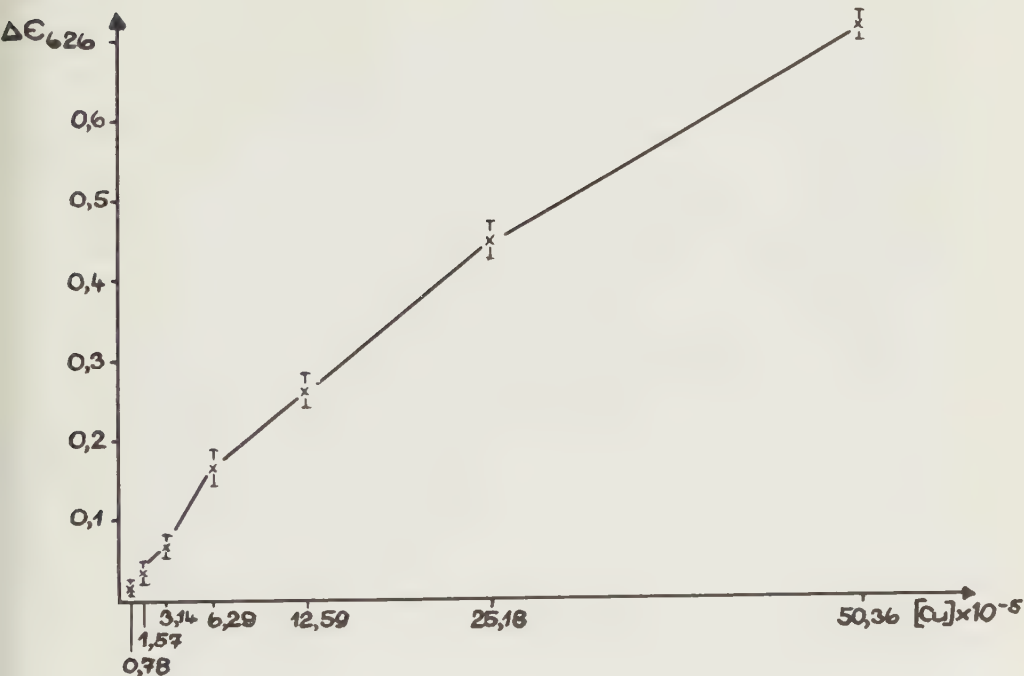


Abb. 4: ΔE_{626} -Entwicklung ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) in hämolysiertem Rattenblut als Funktion der Cu(II)-Konzentration

Abbildung 4 läßt sich entnehmen, daß die Extinktion bei 626 nm mit der Kupferkonzentration ansteigt. Die Korrelation zwischen beiden Parametern ist bei einer SPEARMAN'schen Rangkorrelationszahl von 1 mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 1% signifikant.

4. Artspezifische Unterschiede der Hämiglobinbildung durch Kupfer(II)-acetat

Weitere Versuche dienten zur Klärung der Frage, ob die Hämiglobinbildung durch Kupfer(II)-acetat - ebenso wie die Hämiglobinbildung bei der chronischen Kupfervergiftung - tierartliche Unterschiede aufweist.

Dazu wurden zusätzlich zur Ratte je 6 Blutproben folgender 8 Species untersucht (wie bei III/3 angegeben):

Menschen	:	4 männlich - 2 weiblich
Pferde	:	3 männlich - 3 weiblich
Rinder	:	3 männlich - 3 weiblich
Kälber	:	2 männlich - 4 weiblich
Schafe	:	2 männlich - 4 weiblich
Schweine	:	4 männlich - 2 weiblich
Hunde	:	3 männlich - 3 weiblich
Meerschweinchen:		0 männlich - 6 weiblich

Mit Ausnahme der Kälber wurde das Blut von erwachsenen Individuen verwendet. Die Meerschweinchen wurden, ebenso wie die Ratten, aus der A.carotis entblutet. Das Blut der Wiederkäuer stammte von Schlachttieren, jenes der Pferde und Hunde von gesunden Tieren der Medizinischen Tierklinik.

Das Resultat dieser Versuche ist als Extinktionsdifferenz zwischen Kupfer- und Natriumansatz bei 626 nm in Tabelle 4 eingetragen:

Tab. 4: ΔE_{626} -Entwicklung durch Kupfer(II)-acetat im
Hämolyseblut verschiedener Species

Species	Statist. Para- meter	[Cu] x 10 ⁻⁵						
		0,78	1,57	3,14	6,29	12,59	25,18	50,36
Ratte	n	6	6	6	6	6	6	6
	$\bar{x}$	0,019	0,037	0,067	0,169	0,263	0,450	0,719
	$s_{\bar{x}}$	$\pm 0,008$	$\pm 0,009$	$\pm 0,007$	$\pm 0,017$	$\pm 0,015$	$\pm 0,017$	$\pm 0,015$
Schwein	n	6	6	6	6	6	6	6
	$\bar{x}$	0,004	0,034	0,110	0,216	0,336	0,512	0,907
	$s_{\bar{x}}$	$\pm 0,016$	$\pm 0,015$	$\pm 0,015$	$\pm 0,013$	$\pm 0,013$	$\pm 0,013$	$\pm 0,019$
Mensch	n	6	6	6	6	6	6	6
	$\bar{x}$	0,024	0,063	0,137	0,235	0,378	0,608	0,995
	$s_{\bar{x}}$	$\pm 0,013$	$\pm 0,013$	$\pm 0,014$	$\pm 0,012$	$\pm 0,015$	$\pm 0,013$	$\pm 0,022$
Meer- schwein- chen	n	6	6	6	6	6	6	6
	$\bar{x}$	0,035	0,059	0,128	0,210	0,356	0,612	1,109
	$s_{\bar{x}}$	$\pm 0,008$	$\pm 0,007$	$\pm 0,007$	$\pm 0,006$	$\pm 0,011$	$\pm 0,017$	$\pm 0,023$
Hund	n	6	6	6	6	6	6	6
	$\bar{x}$	0,007	0,075	0,138	0,230	0,477	0,775	1,153
	$s_{\bar{x}}$	$\pm 0,009$	$\pm 0,013$	$\pm 0,016$	$\pm 0,017$	$\pm 0,017$	$\pm 0,019$	$\pm 0,020$

Fortsetzung von Tabelle 4:

Pferd	n	6	6	6	6	6	6	6
	$\bar{x}$	0,031	0,139	0,285	0,555	0,767	0,901	1,306
	$s_{\bar{x}}$	$\pm 0,009$	$\pm 0,013$	$\pm 0,016$	$\pm 0,017$	$\pm 0,017$	$\pm 0,019$	$\pm 0,022$
Kalb	n	6	6	6	6	6	6	6
	$\bar{x}$	0,037	0,097	0,212	0,426	0,692	0,825	1,405
	$s_{\bar{x}}$	$\pm 0,013$	$\pm 0,013$	$\pm 0,015$	$\pm 0,016$	$\pm 0,028$	$\pm 0,025$	$\pm 0,022$
Rind	n	6	6	6	6	6	6	6
	$\bar{x}$	0,058	0,129	0,238	0,484	0,756	0,937	1,414
	$s_{\bar{x}}$	$\pm 0,007$	$\pm 0,009$	$\pm 0,009$	$\pm 0,071$	$\pm 0,011$	$\pm 0,012$	$\pm 0,015$
Schaf	n	6	6	6	6	6	6	6
	$\bar{x}$	0,045	0,112	0,229	0,466	0,747	0,873	1,448
	$s_{\bar{x}}$	$\pm 0,005$	$\pm 0,005$	$\pm 0,006$	$\pm 0,011$	$\pm 0,006$	$\pm 0,008$	$\pm 0,030$

Ein Vergleich der gewonnenen 9 Funktionen mit Hilfe der Varianzanalyse ergab, daß zwischen Rind, Kalb und Schaf sowie zwischen Mensch, Schwein und Meerschweinchen kein Unterschied besteht. Diese beiden Gruppen und die anderen Tierarten unterscheiden sich voneinander mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5%. Dieser Sachverhalt ist in Abbildung 5 graphisch dargestellt.

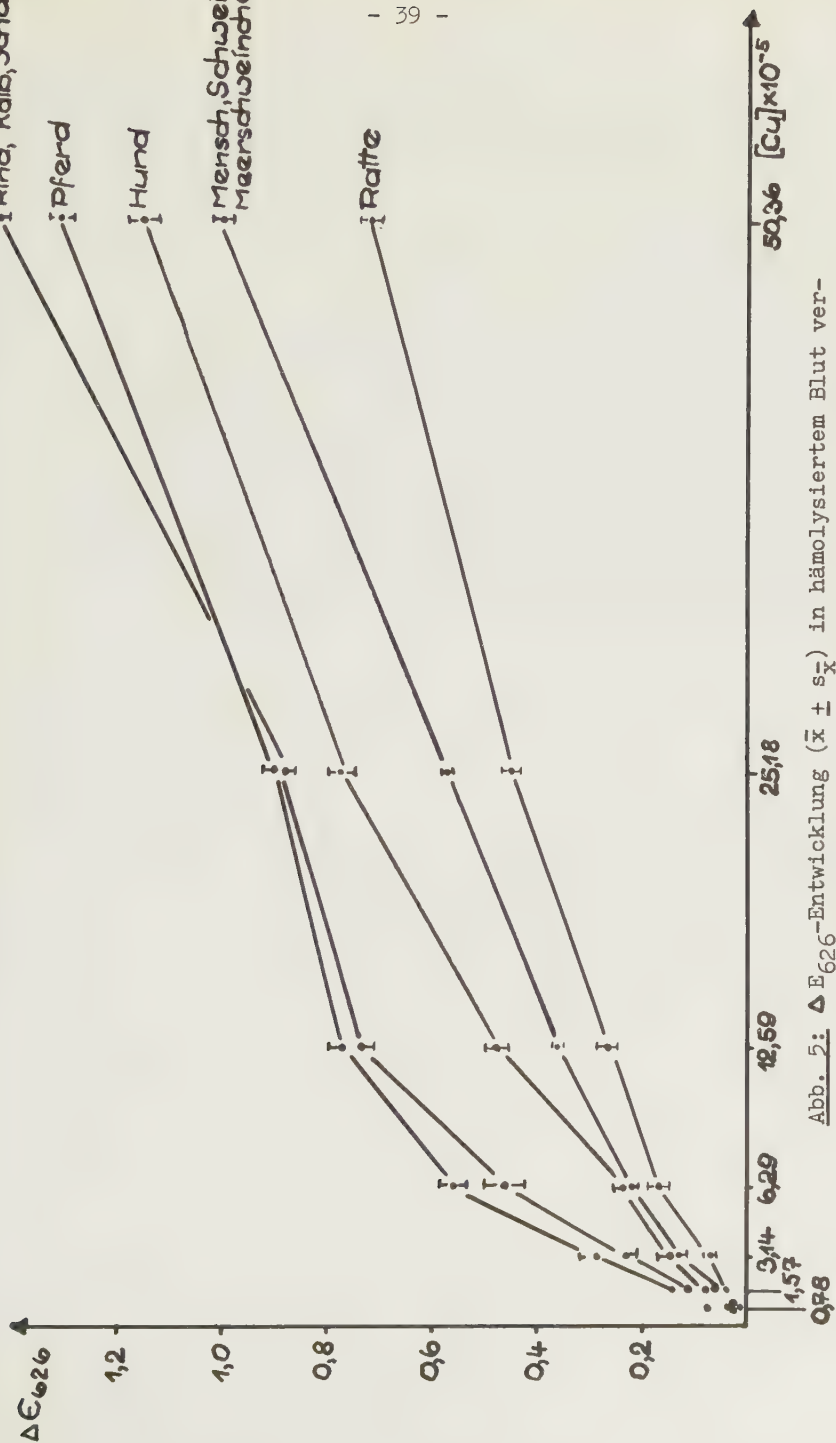


Abb. 5: ΔE_{626} -Entwicklung ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) in hämolysiertem Blut verschiedener Species als Funktion der $Cu(II)$ -Konzentration

5. Einfluß der Erythrozytenmembran auf die Hämiglobin-
bildung durch Kupfer(II)-chlorid

Über die Bedeutung der Erythrozytenmembran für die Hämiglobinbildung durch Kupfer(II)-chlorid orientiert der folgende Versuch.

Er wurde mit n i c h t hämolysiertem Blut (Vollblut) von 12 männlichen Sprague Dawley-Ratten mit einem Gewicht von $351,7 \pm 36,4$ g ($\bar{x} \pm s_x$) durchgeführt. In Abänderung von Versuch 3 wurden die Blutproben mit 0,9%iger NaCl-Lösung anstatt mit destilliertem Wasser verdünnt. Unter Beibehaltung der Molarität wurden in diesem Versuch außerdem Kupfer(II)- bzw. Natriumchloridansätze verwendet, da mit den Acetatansätzen Lösungstrübungen beobachtet wurden. Auf diese Weise wurde folgendes Resultat erzielt:

Tab. 5: Extinktionsentwicklung bei 626 nm in nicht hämolysierten Rattenblut als Funktion der Kupfer(II)- und Natriumkonzentrationen

[Cu(II)] bzw. [Na] $\times 10^{-5}$	Statist. Para- meter	E_{626}		ΔE_{626}
		Cu(II)- Ansatz	Na-Ansatz	
0,78	n $\bar{x}$ $s_{\bar{x}}$	6 0,037 $\pm 0,005$	6 0,033 $\pm 0,003$	0,004 $\pm 0,003$
1,57	n $\bar{x}$ $s_{\bar{x}}$	6 0,053 $\pm 0,006$	6 0,034 $\pm 0,003$	6 0,019 $\pm 0,004$
3,14	n $\bar{x}$ $s_{\bar{x}}$	6 0,064 $\pm 0,006$	6 0,035 $\pm 0,004$	6 0,029 $\pm 0,005$
6,29	n $\bar{x}$ $s_{\bar{x}}$	6 0,085 $\pm 0,008$	6 0,036 $\pm 0,004$	6 0,049 $\pm 0,005$
12,59	n $\bar{x}$ $s_{\bar{x}}$	6 0,103 $\pm 0,007$	6 0,036 $\pm 0,003$	0,067 $\pm 0,004$
25,18	n $\bar{x}$ $s_{\bar{x}}$	6 0,086 $\pm 0,010$	6 0,033 $\pm 0,003$	0,053 $\pm 0,005$
50,36	n $\bar{x}$ $s_{\bar{x}}$	6 0,372 $\pm 0,022$	6 0,038 $\pm 0,005$	0,334 $\pm 0,011$

Dieser Versuch ist als Extinktionsdifferenz zwischen Kupfer- und Natriumansatz in Abbildung 6 graphisch dargestellt:

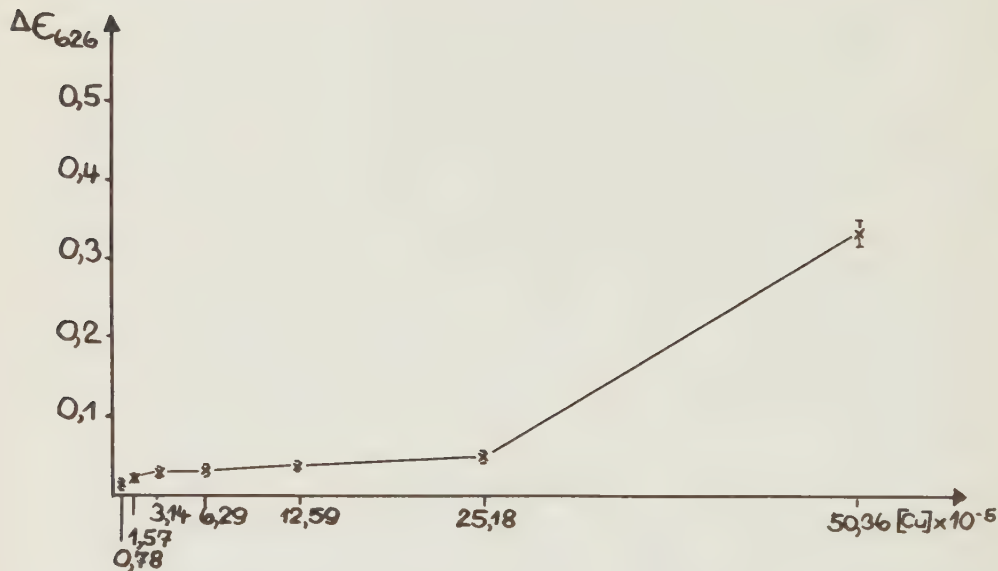


Abb. 6: ΔE_{626} -Entwicklung ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) in nicht hämolysiertem Rattenblut als Funktion der Cu(II)-Konzentration

Der Abbildung läßt sich entnehmen, daß Kupfer(II)-Konzentrationen bis zu $25,18 \times 10^{-5}$ molar keinen Extinktionsanstieg verursachen, während die doppelte Konzentration

zu einer signifikanten Extinktionsentwicklung mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 0,1% führt (t-Test). Dieser Anstieg ist allerdings um mehr als die Hälfte niedriger als bei hämolysiertem Blut.

6. Tierartlich unterschiedliche Bedeutung der Erythrozytenmembran für die Hämiglobinbildung durch Kupfer(II)-chlorid

Weiteres Interesse galt der Fragestellung, ob auch in nicht hämolysiertem Blut eine tierartlich verschiedene Hämiglobinbildung nachweisbar ist.

Für diese Untersuchungen wurden außer der Ratte Blutproben folgender 8 Species verwendet:

Menschen	: 6 männlich - 0 weiblich
Pferde	: 3 männlich - 3 weiblich
Rinder	: 4 männlich - 2 weiblich
Kälber	: 4 männlich - 2 weiblich
Schafe	: 3 männlich - 3 weiblich
Schweine	: 3 männlich - 3 weiblich
Hunde	: 2 männlich - 4 weiblich
Meerschweinchen:	0 männlich - 6 weiblich

Die Versuchsanordnung entsprach dem Versuch 5. Die gemessenen Werte sind der Tabelle 6 zu entnehmen:

Tab. 6: Extinktionsdifferenz bei 626 nm zwischen Kupfer- und Natriumansatz im Vollblut verschiedener Species

Species	Statist. Parameter	$[Cu] \times 10^{-5}$						
		0,78	1,57	3,14	6,29	12,59	25,18	50,36
Ratte	n	12	12	12	12	12	12	12
	$\bar{x}$	0,004	0,019	0,029	0,049	0,067	0,053	0,334
	$s_{\bar{x}}$	$\pm 0,003$	$\pm 0,004$	$\pm 0,004$	$\pm 0,005$	$\pm 0,004$	$\pm 0,005$	$\pm 0,011$
Schwein	n	6	6	6	6	6	6	6
	$\bar{x}$	0,008	0,010	0,016	0,017	0,018	0,035	0,042
	$s_{\bar{x}}$	$\pm 0,001$	$\pm 0,003$	$\pm 0,004$	$\pm 0,003$	$\pm 0,002$	$\pm 0,006$	$\pm 0,005$
Mensch	n	6	6	6	6	6	6	6
	$\bar{x}$	0,003	0,010	0,018	0,017	0,018	0,016	0,173
	$s_{\bar{x}}$	$\pm 0,002$	$\pm 0,002$	$\pm 0,003$	$\pm 0,003$	$\pm 0,002$	$\pm 0,002$	$\pm 0,011$
Meer-schwein-chen	n	6	6	6	6	6	6	6
	$\bar{x}$	0,001	0,000	0,016	0,033	0,036	0,039	0,235
	$s_{\bar{x}}$	$\pm 0,002$	$\pm 0,003$	$\pm 0,002$	$\pm 0,004$	$\pm 0,005$	$\pm 0,004$	$\pm 0,021$
Hund	n	6	6	6	6	6	6	6
	$\bar{x}$	-0,009	0,003	0,007	0,016	0,030	0,026	0,490
	$s_{\bar{x}}$	$\pm 0,002$	$\pm 0,003$	$\pm 0,002$	$\pm 0,004$	$\pm 0,006$	$\pm 0,004$	$\pm 0,030$

Fortsetzung von Tabelle 6:

Pferd	n $\bar{x}$ $s_{\bar{x}}$	6 0,024 $\pm 0,005$	6 0,036 $\pm 0,004$	6 0,060 $\pm 0,005$	6 0,049 $\pm 0,007$	6 0,060 $\pm 0,004$	6 0,072 $\pm 0,003$	6 0,099 $\pm 0,008$
Kalb	n $\bar{x}$ $s_{\bar{x}}$	6 0,026 $\pm 0,004$	6 0,033 $\pm 0,004$	6 0,029 $\pm 0,006$	6 0,030 $\pm 0,005$	6 0,014 $\pm 0,006$	6 0,062 $\pm 0,007$	6 0,068 $\pm 0,010$
Rind	n $\bar{x}$ $s_{\bar{x}}$	6 0,002 $\pm 0,001$	6 0,006 $\pm 0,001$	6 0,007 $\pm 0,002$	6 0,017 $\pm 0,002$	6 0,023 $\pm 0,003$	6 0,032 $\pm 0,001$	6 0,027 $\pm 0,002$
Schaf	n $\bar{x}$ $s_{\bar{x}}$	6 0,020 $\pm 0,003$	6 0,028 $\pm 0,002$	6 0,041 $\pm 0,003$	6 0,046 $\pm 0,005$	6 0,067 $\pm 0,007$	6 0,104 $\pm 0,007$	6 0,080 $\pm 0,003$

Eine graphische Darstellung von Tabelle 6 liegt in Abbildung 7 vor:

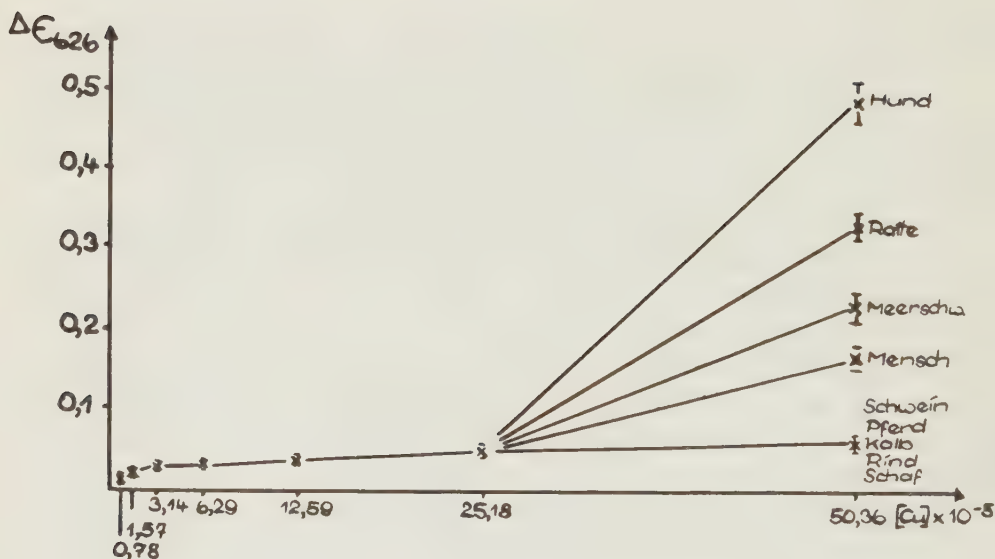


Abb. 7: ΔE_{626} -Entwicklung ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) im Vollblut verschiedener Species als Funktion der Cu(II)-Konzentration

Ein Vergleich der ermittelten Funktionen mit Hilfe der Varianzanalyse ergab, daß Kupferkonzentrationen bis zu $25,18 \times 10^{-5}$ molar bei allen 8 Species und der Ratte keine statistisch unterscheidbare Extinktionsentwicklung bei 626 nm verursachen. Die höchste Kupferkonzentration führt jedoch bei Hunden, Ratten, Meerschweinchen und Menschen

zu Extinktionsanstiegen, welche mit Irrtumswahrscheinlichkeiten von weniger als 0,1 , 0,2 , 0,5 und 5% signifikant von den Extinktionen der übrigen Species differieren.

7. Einfluß des Blutplasmas auf die Hämoglobinbildung durch Kupfer(II)-acetat

Anschließend wurde der Einfluß des Blutplasmas auf die Hämoglobinbildung durch Kupfer(II)-acetat untersucht.

Zu diesem Zweck wurden je 5 ml heparinisiertes Blut von 6 männlichen Ratten mit einem Gewicht von $356,7 \pm 32,3$ g bei 2000 U/min fünf Minuten lang zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes und der Leucozyten wurden die Erythrozyten 2 mal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und mit destilliertem Wasser unter Beibehaltung des ursprünglichen Blutvolumens hämolysiert.

Der weitere Versuchsablauf entsprach dem Versuch 3. Die so erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefaßt.

Tab. 7: Extinktionsentwicklung einer hämolysierten Erythrozytensuspension bei 626 nm als Funktion der Kupfer(II)- und Natriumacetatkonzentrationen

[Cu(II)] bzw. [Na] $\times 10^{-5}$	Statist. Para- meter	E_{626}		ΔE_{626}
		Cu(II)- Ansatz	Na-Ansatz	
0,78	n $\bar{x}$ $s_{\bar{x}}$	6 0,106 $\pm 0,008$	6 0,086 $\pm 0,009$	0,020 $\pm 0,007$
1,57	n $\bar{x}$ $s_{\bar{x}}$	6 0,151 $\pm 0,013$	6 0,087 $\pm 0,010$	0,064 $\pm 0,011$
3,14	n $\bar{x}$ $s_{\bar{x}}$	6 0,213 $\pm 0,020$	6 0,084 $\pm 0,007$	0,129 $\pm 0,012$
6,29	n $\bar{x}$ $s_{\bar{x}}$	6 0,285 $\pm 0,018$	6 0,080 $\pm 0,007$	0,205 $\pm 0,015$
12,59	n $\bar{x}$ $s_{\bar{x}}$	6 0,554 $\pm 0,027$	6 0,081 $\pm 0,006$	0,473 $\pm 0,015$
25,18	n $\bar{x}$ $s_{\bar{x}}$	6 0,756 $\pm 0,011$	6 0,084 $\pm 0,006$	0,672 $\pm 0,008$
50,36	n $\bar{x}$ $s_{\bar{x}}$	6 1,153 $\pm 0,014$	6 0,083 $\pm 0,009$	1,070 $\pm 0,010$

Die Extinktionsdifferenzen dieses Versuches sind in Abbildung 8 dargestellt.

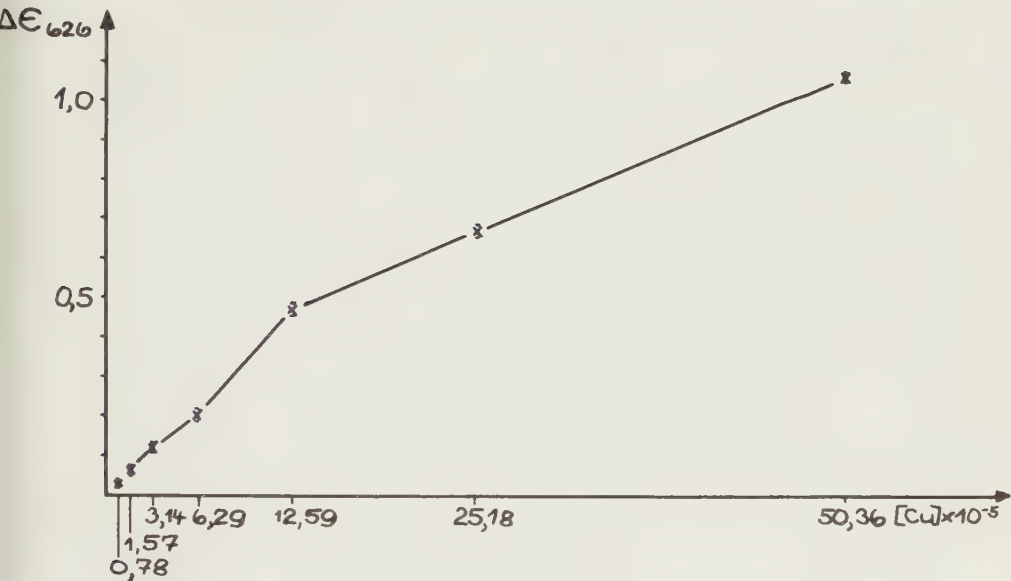


Abb. 8: ΔE_{626} -Entwicklung ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) in hämolysierter Erythrozytensuspension als Funktion der Kupfer(II)-Konzentration

Der graphischen Darstellung läßt sich entnehmen, daß auch bei der hämolysierten Erythrozytensuspension ein kupferabhängiger Extinktionsanstieg zu beobachten ist.

Er ist bei Kupferkonzentrationen von 12,59 , 25,18 und $50,36 \times 10^{-5}$ molar mit Irrtumswahrscheinlichkeiten von weniger als 5, 1 und 0,1 höher als im Hämolyseblut.

Die unterschiedliche Extinktionsentwicklung bei Verwendung von nicht hämolysiertem Blut (Vollblut), hämolysiertem Blut (Hämolyseblut) und hämolysierter Erythrozytensuspension (Erythrozytensuspension) ist in Abbildung 9 veranschaulicht.

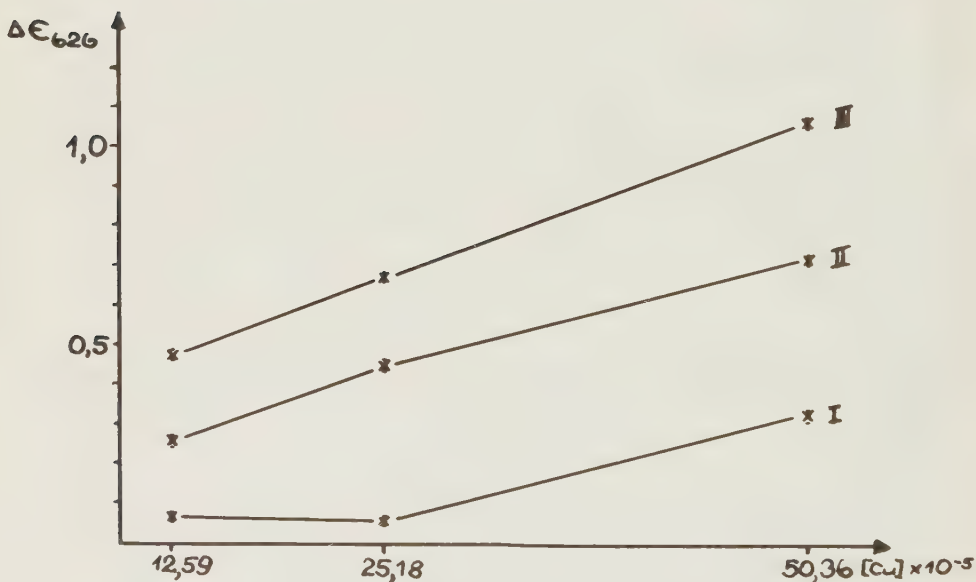


Abb. 9: ΔE_{626} -Entwicklung ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) in Vollblut (I), Hämolyseblut (II) und Erythrozytensuspension (III) als Funktion der Kupfer(II)-acetatkonzentration

Die Abbildung zeigt, daß die Extinktionsentwicklung bei 626 nm in der Reihenfolge Vollblut < Hämolyseblut < Erythrozytensuspension ansteigt. Eine statistische Auswertung ergab bei allen Kupferkonzentrationen, daß die Differenz zwischen Vollblut und den übrigen Ansätzen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von <0,1% signifikant ist.

IV. DISKUSSION

Aus den durchgeführten Versuchen ergeben sich in Verbindung mit der Literatur einige Schlußfolgerungen:

Hämiglobinbildung durch Kupfer

Tabelle 1 und Abbildung 2 zeigen, daß zweiwertiges Kupfer freies Hämoglobin zu Hämiglobin oxidieren kann. Diese Oxidation ist kupferspezifisch, da sie nach Tabelle 3 und Abbildung 4 eine eindeutige Abhängigkeit von der Kupferkonzentration aufweist. Aus dieser Tabelle bzw. Abbildung ergibt sich weiterhin, daß die Hämiglobinbildung in vitro bei Kupferkonzentrationen (2 - 32 ppm) erfolgt, wie sie in vivo auch bei der hämolytischen Krise gefunden werden (bis 25 ppm: 139). Es liegt deshalb nahe, dem Anstieg der Kupferkonzentration im Blut bis zum Beginn der hämolytischen Krise eine entscheidende Bedeutung für die Hämiglobinbildung im Endstadium der chronischen Kupfervergiftung beizumessen.

Eine oxidierende Wirkung des Kupfers auf das zweiwertige Hämeisen wurde interessanterweise bereits im Jahre 1883 von ELLENBERGER und HOFMEISTER bei Schafblutproben beschrieben (37). Aus den letzten Jahren liegen weitere Untersuchungen vor, in welchen SNYDER und SKRDLANT (135) von einer Oxidationsbeschleunigung des Myoglobins durch Kupfer(II)-Ionen und SALVATI et al. (124) von der starken Oxidationswirkung des Kupfers auf Hämoglobin im Vergleich zu anderen Metallen berichten.

Für die kupferspezifische Hämiglobinbildung sind zwei Reaktionsabläufe denkbar:

1. Kupfer reagiert d i r e k t mit Hämoglobin, wird dabei reduziert und durch Sauerstoff wieder oxidiert.

Auf diese Weise könnte die Hämoglobinbildung stark katalysiert werden.

2. Kupfer führt über eine sog. gekoppelte Oxidation zu Hämoglobin. Diese Reaktion ist von zahlreichen anderen Hämoglobinbildnern bekannt (5). Dabei entsteht intermediär Wasserstoffperoxid, welches seinerseits den roten Blutfarbstoff oxidiert.

Welcher dieser beiden Mechanismen im Falle des Kupfers realisiert ist, läßt sich anhand der Literatur und der Versuchsergebnisse nicht entscheiden.

Zeitabhängigkeit der kupferspezifischen Hämoglobinbildung

Die Hämoglobinbildung verläuft in vitro überraschend schnell. Dies ergibt sich aus Tabelle 2 bzw. Abbildung 3. Sie zeigen, daß die "initiale Extinktionsentwicklung" innerhalb von 4 bis 5 Minuten zu einer Extinktionsverdoppelung führt und im Verlauf der folgenden zwei Stunden - wahrscheinlich auch danach - ansteigt.

In vivo verläuft die Hämoglobinbildung zeitlich in einer ähnlichen Größenordnung und erklärt den raschen Eintritt des Exitus in der hämolytischen Krise.

Bedeutung der Erythrozytenmembran bei der kupferspezifischen Hämoglobinbildung

Eine Erklärung für den plötzlichen Beginn der rasch verlaufenden Hämoglobinbildung legen die Ergebnisse von Tabelle 5 und Abbildung 6 nahe. Sie demonstrieren, daß die Kupferkonzentration von rund $0,8 \times 10^{-5}$ bis 25×10^{-5} Mol/liter gesteigert werden kann, ohne daß die Hämoglobinbildung in Gang kommt. Bei weiterer Erhöhung der Kupferkonzentration wird dann jedoch offenbar ein Grenzwert (zwischen

rund 25 und 50×10^{-5} Mol/Liter) überschritten, mit dessen Erreichen die Hämoglobinbildung einsetzt. Da dieses Phänomen nur bei nicht hämolysiertem Blut, dagegen nicht bei Hämoglobininlösungen (Hämolysenblut) auftritt, liegt es nahe, den Beginn der Hämoglobinbildung mit dem Eintritt einer kupferbedingten Hämolysen in Verbindung zu bringen.

Über die hämolytische Wirkung des Kupfers wird von verschiedenen Autoren berichtet:

FAIRBANKS (43) beschreibt beim Menschen einen Fall mit akuter hämolytischer Anämie nach zufälliger oraler Aufnahme von Kupfersulfat. In vitro stellen LAMBIN et al. (80) fest, daß bereits kleine Kupferkonzentrationen ($0,4 - 0,5$ ppm) zu einer Membranschädigung bei Erythrozyten führen können, welche in $0,9\%$ iger Kochsalzlösung suspendiert sind. GOLDBERG et al. (52) bestätigen diese Versuche, indem sie mit einer Kupferkonzentration von $0,75$ ppm Hämolysen in Erythrozytensuspensionen von Huhn, Kaninchen und Mensch hervorrufen. Wenn andererseits die Erythrozyten in Blutserum suspendiert werden, so bleiben selbst Kupferkonzentrationen bis zu 50 ppm ohne hämolytische Wirkung. Dies dürfte auf Schutzfaktoren des Serums, zum Beispiel Glucose oder Glutathion zurückzuführen sein.

Der Hämolyseneffekt des Kupfers kann wie folgt erklärt werden:

Kupfer ist ein nicht kompetitiver Hemmstoff der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (43, 115), deren Ausfall zu Hämolysenbereitschaft führt. Dies zeigen Träger eines genetisch bedingten Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-mangels (87). Eine Folge der Fermenthemmung ist die eingeschränkte NADPH-Bereitstellung und - davon abhängig - eine verminderte Reduktion des Glutathions (87).

Reduziertes Glutathion (GSH) ist jedoch in mehrfacher Hinsicht essentiell für die Intaktheit der Erythrozyten: Es schützt verschiedene SH-haltige Fermente und Pyridinnucleo-

tide gegen eine Oxidation und es hemmt die oxidative Denaturierung des Hämoglobins (87).

Neben einer Hemmung der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase katalysiert Kupfer die Oxidation der Nicotinamidnucleotide (87) und des GSH (43, 153). Daraus resultiert eine ATP-Verarmung und als weitere Folge ein Zusammenbruch des Erythrozytenstoffwechsels mit Hämolyse (87).

Tierartliche Empfindlichkeitsunterschiede bei der Hämoglobinbildung durch Kupfer

Die besondere Häufigkeit einer chronischen Kupfervergiftung bei Wiederkäuern mit Entwicklung einer hämolytischen Krise kann nach den Ergebnissen von Tabelle 6 bzw. Abbildung 7 nicht mit einer ausgeprägten Instabilität der Erythrozytenmembran dieser Tierarten in Verbindung gebracht werden. Bei Einbeziehung der obenerwähnten Schlußfolgerung, daß der Hämoglobinbildung offensichtlich eine Hämolyse vorausgeht, ergibt sich nämlich aus dieser Tabelle bzw. Abbildung, daß die Erythrozytenmembran der Wiederkäuer stabiler ist als bei den anderen untersuchten Arten.

Eine Erklärung der in Tabelle 6 bzw. Abbildung 7 dargestellten Stabilitätsunterschiede der Erythrozytenmembran kann deren verschiedener Lecithingehalt sein. Er steigt nach DE GIER und VAN DEENEN (50) in der Reihenfolge Schaf, Ochse, Schwein, Mensch, Kaninchen, Ratte an und begünstigt wegen des hohen Gehaltes der Lecithine an ungesättigten Fettsäuren eine oxidative Membranschädigung durch Kupfer im Sinne der im Literaturteil besprochenen Lipidperoxidation.

Aufgrund der vorstehenden Überlegungen liegt es nahe, andere Ursachen als die Erythrozytenmembran für die Wiederkäuerempfindlichkeit gegen Kupfer in Betracht zu ziehen.

Zu diesen zählt in erster Linie die Struktur des Hämoglobins, genauer: des Globinanteils, da dieser tierartliche Unterschiede aufweist. Solche Unterschiede bestehen in der Aminosäuresequenz der Polypeptidketten und sind umso deutlicher, je größer der phylogenetische Abstand der verglichenen Arten ist. So sind zum Beispiel die α -Ketten von Schaf und Ziege identisch (64), das Globingerüst des Menschen weicht nur geringfügig von dem des Schimpansen ab (166), während sich die Sequenz der α -Ketten des Menschen vom Pferd bereits in 15 - 20 Aminosäuren unterscheidet (64); siehe hierzu auch Abbildung 10:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Mensch	val	leu	ser	pro	ala	asp	lys	thr	asp	val	lys	ala
Pferd	val	leu	ser	ala	ala	asp	lys	thr	asp	val	lys	ala
Kaninchen	val	leu	ser	pro	ala	asp	lys	thr	asp	ile	lys	ala
Schaf	val	leu	ser	ala	ala	asp	lys	ser	asp	val	lys	ala

Abb. 10: Variationen in der Reihenfolge der ersten 12 Aminosäuren der α -Ketten von Mensch, Pferd, Kaninchen und Schaf (nach JONXIS: 68)

Die Aminosäuresequenz kann in folgender Hinsicht für eine Hämoglobinbildung von Bedeutung sein:

Die Oxidabilität des Hämeisens, das mit der 5. und 6. Koordinationsvalenz an bestimmte Aminosäuren des Polypeptidknäuels verankert ist, könnte von der Art dieser Aminosäuren beeinflusst werden. Beispielsweise zeichnen sich gewisse Hämoglobinanomalien des Menschen, welche geringfügige Änderungen des Aminosäurenmusters aufweisen, durch eine gesteigerte Oxidabilität der abnormen Hämoglobine aus (14). Möglicherweise ist auch die besondere Oxidationsempfindlichkeit der Wiederkäuer mit artunterschiedlichen Aminosäuren in der unmittelbaren Umgebung des Eisenatoms zu erklären.

Einen Eindruck der räumlichen Zuordnungen von Aminosäuren und Hämeisen beim Menschen vermittelt Abbildung 11:

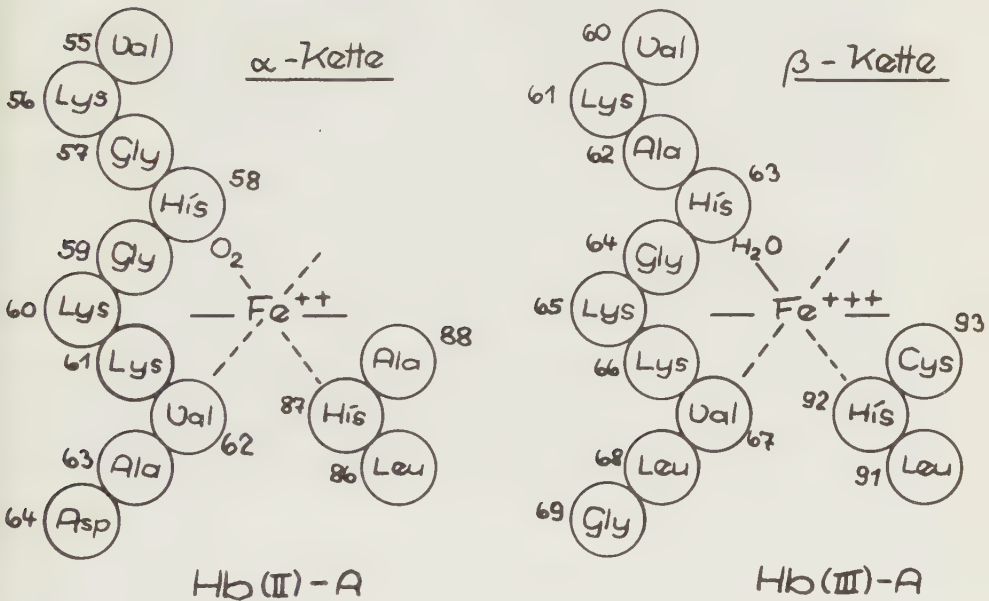


Abb. 11: Schematische Beziehung des Hämeisens zu den Aminosäuren der zugeordneten helikalen Bereiche der Polypeptidketten beim Menschen (nach BETKE: 14)

Eine weitere Ursache für die Kupferempfindlichkeit der Wiederkäuer mag die Persistenz des fetalen Hämoglobins dieser

Tierarten sein. Es läßt sich beispielsweise beim Rind bis zum Alter von einem Jahr nachweisen (9) und wird etwa doppelt so schnell wie adultes Hämoglobin oxidiert (13).

Im Zusammenhang mit der tierartlichen Verschiedenheit der Hämoglobinbildung sei abschließend auf die unterschiedliche Hämoglobinerückbildung hingewiesen. Sie ist bei Mäusen und Kaninchen infolge der höheren Aktivität der NADH-abhängigen Methämoglobinreductase größer als beim Fleischfresser und Menschen (138). Dies erklärt möglicherweise die gefundenen und in Tabelle 4 bzw. Abbildung 5 dargestellten tierartlichen Unterschiede der Hämoglobinbildung im Hämolyseblut.

Therapeutische Konsequenzen

Als wichtigste therapeutische Konsequenz ergibt sich aus den durchgeführten Untersuchungen eine unverzügliche Inaktivierung des Kupfers zu Beginn der hämolytischen Krise mit geeigneten Thiolen (BAL, D-Penicillamin) oder Chelatbildnern (EDTA), da sich der Anstieg der Kupferkonzentration im Blut als entscheidender Faktor beim Zustandekommen der Hämoglobinbildung erwiesen hat.

V. ZUSAMMENFASSUNG

1. Als Beitrag zum Mechanismus der Hämoglobinbildung bei der chronischen Kupfervergiftung der Wiederkäuer wurden vergleichende in vitro-Versuche mit Blutproben von Menschen, Pferden, Rindern, Kälbern, Schafen, Schweinen, Hunden, Meerschweinchen und Ratten durchgeführt.
2. Kupfer(II)-Ionen oxidieren in Konzentrationen, wie sie bei der hämolytischen Krise im Blut von Wiederkäuern gemessen werden, freies Hämoglobin zu Hämoglobin.
3. Die Hämoglobinbildung nimmt mit steigenden Kupferkonzentrationen zu und ist somit kupferspezifisch.
4. Die kupferspezifische Hämoglobinbildung zeigt eine nicht lineare Abhängigkeit von der Zeit, verläuft rasch (initiale Extinktionsverdoppelung in ca. 4 - 5 Minuten) und liegt damit in einer zeitlichen Größenordnung wie bei der hämolytischen Krise.
5. Die Oxidationsempfindlichkeit freien Hämoglobins gegen Kupfer(II)-Ionen ist speciesverschieden und nimmt in der Reihenfolge Ratte < Schwein=Meerschweinchen=Mensch < Pferd < Wiederkäuer zu.
6. In nicht hämolysiertem Blut verschiedener Species ist die Hämoglobinbildung erst im Bereich der höchsten verwendeten Konzentrationen (16 - 32 ppm) zu beobachten und tritt hier nur bei 4 Arten in der Reihenfolge Mensch < Meerschweinchen < Ratte < Hund auf. Dies legt nahe, daß bei der hämolytischen Krise die Hämolysen der Hämoglobinbildung zeitlich vorausgeht.

7. Die Hämoglobinbildung verläuft in hämolysierter Erythrozytensuspension rascher als in hämolysiertem Vollblut.
8. Die besondere Empfindlichkeit der Wiederkäuer gegen die chronische Aufnahme von Kupfer kann nicht auf eine spezifische Instabilität der Erythrozytenmembran dieser Tierarten zurückgeführt werden. Sie findet eine befriedigende Erklärung durch Annahme einer besonderen Oxidationsempfindlichkeit des Hämoglobins und die Persistenz des fetalen Hämoglobins bei diesen Tierarten.
9. Als wichtigste therapeutische Konsequenz ergibt sich eine möglichst rasche Inaktivierung des Kupfers zu Beginn der hämolytischen Krise.
10. Die Ergebnisse sowie die wahrscheinliche Genese der hämolytischen Krise werden diskutiert.

SUMMARY

1. As contribution to the mechanism of the production of hemiglobin in chronic copper poisoning of ruminants, comparative in vitro-experiments were performed in the blood of human beings, horses, cattle, calves, sheep, pigs, dogs, guinea-pigs and rats.
2. Copper(II)-ions oxidize in concentrations corresponding to those of the hemolytic crisis, free hemoglobin into hemiglobin.
3. The formation of hemiglobin increases in correlation to the copper concentrations. It is consequently specific for copper.
4. The copper-specific formation of hemiglobin demonstrates a non-linear dependence on time; a fast process (initial doubling of extinction in about 4 - 5 minutes) which resembles the one during the hemolytic crisis.
5. The oxidation susceptibility of free hemoglobin against copper(II)-ions is different according to the species with following sequence: rat < pig=guinea-pig=man < horse < ruminants.
6. The formation of hemiglobin in non-hemolysed blood of different species could only be proved in the maximum concentrations (16 - 32 ppm) and is only found in following four species: human being < guinea-pig < rat < dog. Thus presuming, the hemolysis in the hemolytic crisis precedes the formation of hemiglobin.
7. Hemiglobin is produced faster in hemolysed suspension of erythrocytes than in hemolysed full-blood.

8. The special susceptibility of ruminants to the chronic feeding of copper cannot be related with a specific membrane-instability of the erythrocytes of these animals. It has a satisfying explanation by the supposition of a special oxidation susceptibility of hemoglobin and the persistence of fetal hemoglobin in these animals.
9. The most important therapeutical consequence is an immediate inactivation of copper in the beginning of the hemolytic crisis.
10. The results as well as the probable genesis of the hemolytic crisis are discussed.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. ALLCROFT, R. (1955) zit. nach PEARSON, J.K. (116)
2. ALLCROFT, R.
Copper poisoning
Vet. Rec. 72, 483, 1960
3. ALLCROFT, R.
The use and misuse of mineral supplements
Vet. Rec. 73, 1255, 1961
4. ARUTYUNYAN, L.G. und V.R. SOROKA
Effect of elevated air temperature on copper and
manganese metabolism in animals
Gig. Sanit. 35, 107, 1970
5. BANASCHAK, H.
Exogene Methämoglobinämien
in: Fortschritte der Hämatologie Bd.1, 157 - 188
Hrsg.: PERLICH, E., W.PLENERT und O.PROKOP
Leipzig, Johann Ambrosius Barth Verlag, 1971
6. BARBER, R.S., R.BRANDE, K.G. MITCHELL, A.F. ROOK
und J.G. ROWELL
Untersuchungen über Antibiotica- und Kupferergän-
zungen für Mastschweine
Brit. J. Nutr. 11, 70, 1957
7. BARDEN, P.J. und A. ROBERTSON
Experimental copper poisoning in sheep
Vet. Rec. 74, 252, 1962

8. BARLOW, R.M., D.PURVES, E.J. BUTLER und I.J. MCINTYRE
Swayback in South-East Scotland
II. Clinical, pathological and biochemical aspects
J. Comp. Path. 70, 411, 1960
9. BAUR, P.
Untersuchungen zur Ätiologie und Pathogenese einer
durch Ikterus, Leberzirrhose und Leberdystrophie ge-
kennzeichneten Kälberkrankheit
Diss. med. vet., München, 1967
10. BEARN, A.G.
WILSON's disease
in: The metabolic basis of inherited disease
New York, McGraw-Hill Book Comp., 1966
11. BEHRENS, H. und G. MATSCHULLAT
Die chronische Kupfervergiftung der Schafe
Tierärztl. Umschau, 5, 224, 1969
12. BENCE, J., J.LENDVAI und J.SZEKELY
Der Cu-Gehalt des Blutes bei Anämien
Z. klin. Med. 130, 299, 1936
13. BETKE, K.
Der menschliche Blutfarbstoff
Berlin-Göttingen-Heidelberg, Springer Verlag, 1954
14. BETKE, K.
Methämoglobinämien
in: Handbuch der inneren Medizin Bd. II/2, 425 - 442
Hrsg.: HEILMEYER, L.
Berlin-Heidelberg-New York, Springer Verlag, 1970

15. BISCHOFF, O. und F. HAUN
Vergiftungen durch kupfer- und arsenhaltigen
Flugstaub
Dt. tierärztl. Wschr. 47, 442, 1939
16. BOSMAN, M.S.M.
Sulfides in rumen liquor of cattle in relation to
the feed and its possible influence on copper metabolism
Inst. Biol. Scheik. Onderz. Landbouwgewassen
Wageningen-Meded. 314/325, 73, 1966
17. BOWLAND, J.P., R.BRANDE, A.G. CHAMBERLAIN, R.F.
GLASCOCK und K.G. MITCHELL
The absorption, distribution and excretion of labeled
copper in young pigs given different quantities as
sulphate or sulfide orally or i.v.
Brit. J. Nutr. 15, 59, 1961
18. BRENNER, W.
Die Bedeutung des Kupfers in Biologie und Pathologie
unter besonderer Berücksichtigung des wachsenden Or-
ganismus
in: Ergebnisse der inneren Medizin und Kinderheil-
kunde, Neue Folge Bd. 4, 806 - 974
Hrsg.: HEILMEYER, L., A.SCHITTENHEIM, R.SCHOEN,
E. GLANZMANN und B. DE RUDDER
Berlin, Springer Verlag, 1953
19. BRUN, A. und U. BRUNK
Histochemical indications for lysosomal localization
of heavy metals in normal rat brain and liver
J. Histochem. Cytochem. 18, 820, 1970
20. BUBIEN, Z., M.MORAND, J.GASTELLU und A.MAGAT
Intoxication expérimental du poulet par le
sulfate de cuivre
Rév. Méd. Vét. 122, 511, 1971

21. BUNTAİN, D.
Deaths in pigs on a high copper diet
Vet. Rec. 73, 707, 1961
22. BULL, L.B.
Copper poisoning of sheep
in: International encyclopedia of veterinary medicine
Vol. 2, 702 - 704
Eds.: DALLING, T., A.ROBERTSON, G.F.BODDIE und
J.S.A.SPRUELL
Edinburgh, W.Green & Son Ltd., 1966
23. BURGISSER, H.
Ictère du veau alimenté artificiellement
Schweiz. Arch. Tierheilk. 107, 101, 1965
24. CARTWRIGHT, G.E. und M.M. WINTROBE
Copper metabolism in normal subjects
Amer. J. clin. Nutr. 14, 224, 1964
25. CLEGG, F.G.
An outbreak of copper poisoning in sheep
Vet. Rec. 68, 332, 1956
26. COLE, V.G.
Copper poisoning
in: Diseases of sheep
London-Sydney, Angus und Robertson, 1966
27. COMAR, C.L., G.K.DAVIS und L.SINGER
The fate of radioactive copper administered
to the bovine
J. biol. Chem. 174, 905, 1948

28. CRAMPTON, R.F., D.M.MATTHEWS und R.POISNER
Untersuchungen über den Resorptionsmechanismus
des Kupfers im Dünndarm
J. Physiol. 178, 111, 1965
29. CUNNINGHAM, I.J.
Some biochemical and physiological aspects of
copper in animal nutrition
Biochem. J. 25, 1267, 1931
30. DANCKWORTT, P.W.
Tierversgiftungen durch Fabrikabgase
Dt. tierärztl. Wschr. 47, 277, 1939
31. DARBY, W.J.
Iron and copper
J. Amer. med. Ass. 142, 1288, 1950
32. DAWSON, C.R. und W.B. TARPLEY
Copper oxidases
in: The enzymes, Vol. II, 454 ff
Eds.: SUMNER, J.B. und K. MYRBÖCK
New York, Academic Press, 1951
33. DICK, A.T.
Molybdenum and copper relationships in animal nutrition
in: Inorganic nitrogen metabolism, 445 ff
Eds.: MCELROY, W.D. und B. GLASS
Baltimore, John Hopkins, 1956
34. EDEN, A.
The influence of varying copper intake on normal
blood copper of Northumbrian sheep
J. Comp. Path. 52, 249, 1939

35. EDEN, A. und H.H. GREEN
The fate of copper in the bloodstream
J. Comp. Path. 52, 301, 1939
36. EICHHOLTZ, F.
Kupfer
in: Handbuch der experimentellen Pharmakologie
Bd. 3/3, 1928 - 1970
Eds.: HEFTER, A. und W. HEUBNER
Berlin, Julius Springer Verlag, 1934
37. ELLENBERGER, W. und V. HOFMEISTER
Die physiologischen Wirkungen des Kupfers auf den
Organismus der wiederkäuenden Haussäugetiere
Arch. wiss. prakt. Tierheilk. 2, 325, 1883
38. ELVEHJEM, C.A. und W.C. SHERMAN
The action of copper in iron metabolism
J. biol. Chem. 98, 309, 1932
39. EVANS, G.W. und R.E. WIEDERANDERS
Blood copper variations among species
Amer. J. Physiol. 213, 1183, 1967
40. EVANS, G.W. und R.E. WIEDERANDERS
Copper distribution in the neonatal rat
Amer. J. Physiol. 213, 1177, 1967
41. EVANS, G.W., D.R.MYRON und R.E.WIEDERANDERS
Effect of proteinsynthesis inhibitors on plasma
ceruloplasmin in the rat
Amer. J. Physiol. 216, 340, 1969

42. EVANS, G.W., N.F.CORNATZER und W.E.CORNATZER
Mechanism for hormone-induced alterations in
serum ceruloplasmin
Amer. J. Physiol. 218, 613, 1970
43. FAIRBANKS, V.F.
Hämolytische Anämie durch Kupfersulfat
Archs.intern. Med. 120, 428, 1967
44. FIELD, H.J.
Observations on copper deficiency in cattle
in East Anglia
Vet. Rec. 69, 788 ff und 832 ff, 1957
45. FINCH, F.B.
Methemoglobinemia and sulfhemoglobinemia
New Engl. J. Med. 239, 470, 1948
46. GALLAGHER, C.H.
The pathology and biochemistry of copper deficiency
Aust. vet. J. 33, 311, 1957
47. GALLACHER, C.H., J.D.JUDAH und K.R.REES
The biochemistry of copper deficiency
Proc. Roy. Soc. 145, 134 ff und 195 ff, 1956
48. GARNER, R.J.
Kupfer
in: Veterinärmedizinische Toxikologie, 84 - 88
Jena, VEB Gustav Fischer Verlag, 1968
49. GELDER VAN, B.F. und A. VELDSEMA
Different species of copper in ceruloplasmin
Biochim. biophys. Acta 130, 267, 1966

50. GIER DE, J. und L.L.M. VAN DEENEN
Some lipid characteristics of red cell membrane of
various animal species
Biochim. biophys. Acta 49, 286, 1961
51. GITLIN, D., W.J.HUGES and C.H.JANEWAY
Absorption and excretion of copper in mice
Nature, Lond. 188, 150, 1960
52. GOLDBERG, A., C.B.WILLIAMS, R.S.JONES, M.YANAGITA,
G.E.CARTWRIGHT und M.M.WINTROBE
Studies on copper metabolism
XXII. Hemolytic anemia in chickens induced by the
administration of copper
J. Lab. clin. Med. 48, 442, 1956
53. GOLDFISHER, S.
The localisation of copper in the pericanalicular
granules of the liver in WILSON's disease
Amer. J. Pathol. 46, 977, 1965
54. GOLDFISHER, S. und J. MOSKAL
Electrone probe microanalysis of liver in
WILSON's disease
Amer. J. Pathol. 48, 305, 1966
55. GORDON, W.A.M. und D. LUKE
Copper poisoning in the pig
Vet. Rec. 69, 37, 1957
56. GRACEY, J.F. und J.R. TODD
Chronic copper poisoning in sheep following the
use of copper sulfate as molluscide
Brit. vet. J. 116, 405, 1960

57. GRAY, L.F. und L.D. DANIEL
Effect of copper status of the rat on the copper -
molybdenum - sulfate interaction
J. Nutr. 84, 31, 1964
58. GUILBRIDE, P.D.L.
A copper crisis syndrom in cross bred sheep
Brit. vet. J. 119, 512, 1963
59. GÜRTLER, H. und H. SCHÜTZLER
Zum Verhalten des Eisen- und Kupferstatus bei
Kälbern nach der Geburt
Mh. Veterinärmed. 26, 255, 1971
60. HARAMBLIE, G. und J. KENL
Das Verhalten von Serumceruloplasmin und -Kupfer
bei langdauernder Körperbelastung
Ärztl. Forsch. 24, 112, 1970
61. HARRIS, D.I.M. und A. SASS-KORTSAK
The influence of aminoacids on copper uptake
by rat liver sclices
J. clin. Invest. 46, 659, 1967
62. HAWKE, W.M., T.H.HOLMES und A.SASS-KORTSAK
Intracellular pathways of copper in rat liver
Gastroenterology 46, 309, 1964
63. HILL, R. und H.L. WILLIAMS
The effects of intensively reared lambs of diets
containing excess copper
Vet. Rec. 77, 1043, 1965
64. HOLLAN, S.R.
Hämoglobine und Hämoglobinopathien
in: Fortschritte der Hämatologie, Bd. 1, 95 - 124
Hrsg.: PERLICH, E., W.PLENERT und O.PROKOP
Leipzig, Johann Ambrosius Barth, 1971

65. HOLMBERG, C.H. und C.B. LAURELL
Investigation in serum copper
II. Isolation of the copper containing protein and
description of some of its properties
Acta chem. scand. 2, 550, 1948
66. ISMAEL, J., C.GOPINATH und J.M.HOWELL
Experimental chronic copper toxicity in sheep:
Histological and histochemical changes during the
development of the lesions in the liver
Res. Vet. Sci. 12, 358, 1971
67. JANDL, J.H., L.K.ENGLE und D.W.ALLEN
Oxidative hemolysis and precipitation of hemoglobin
I. HEINZ body anemias as an acceleration of red
cell aging
J. clin. Invest. 39, 1818, 1960
68. JONXIS, J.H.P.
Hämoglobinstruktur und Hämoglobinsynthese
in: Handbuch der Kinderheilkunde, Bd. VI, 651 - 661
Hrsg.: OPITZ, H. und F. SCHMID
Berlin-Heidelberg-New York, Springer Verlag, 1967
69. KEIDERLING, W. und J. REISSNER
Eisen- und Kupferstoffwechsel
in: Klinik der Gegenwart, Bd. 10, 147 - 167
Hrsg.: COBET, R., K.GUTZEIT, H.E. BOCK und F.HARTMANN
München-Berlin, Urban und Schwarzenberg, 1960
70. KIRCHGEßNER, M.
Wechselbeziehungen zwischen Spurenelementen in Futter-
mitteln und tierischen Substanzen sowie einzelnen Ele-
menten bei der Retention
Z. Tierphysiol. Tierernähr. Futtermittelk. 14, 278,
1959

71. KIRCHGESSNER, M.
Der Einfluß einer Antibioticumzulage auf die Retention
verschiedener Spurenelemente bei wachsenden Schweinen
in: Festschrift zum VIII. Internationalen Tierzucht-
kongreß in Hamburg, 95 - 97
Stuttgart, Eugen Ulmer Verlag, 1961
72. KIRCHGESSNER, M.
Mineral- und Futterstoffe in der Nutztierhaltung
Z. wirtschaftseig. Futter 9, 230, 1963
73. KIRCHGESSNER, M. und H. GIESSLER
Der Einfluß einer Kupfersulfatzulage auf den N-Ansatz
wachsender Schweine
Z. Tierphysiol. Tierernähr. Futtermittelk. 16, 297, 1961
74. KIRCHGESSNER, M. und H. FRIESECKE
Kupfer
in: Wirkstoffe in der praktischen Tierernährung, 21 - 30
München-Basel-Wien, Bayerischer Landwirtschaftsverlag,
1966
75. KIRCHGESSNER, M., U.WESER und H.L.MÜLLER
Absorption einiger Mono-, Oligo- und polymerer
Aminosäurekupferkomplexe
Z. Tierphysiol. Tierernähr. Futtermittelk. 22, 76, 1967
76. KOLB, E.
Pathophysiologie der Ernährung: I. Spurenelemente
in: Lehrbuch der Pathologischen Physiologie der
Haustiere, 246 - 259
Hrsg.: PÖTEL, K.
Jena, VEB Gustav Fischer Verlag, 1969

77. KOWALCYK, T., A.L.POPE, K.C.BERGER und B.A. MUGGENBURG
Chronic copper toxicosis in sheep fed dry feed
J. Amer. vet. Ass. 145, 352, 1964
78. KÜHNERT, M.
Industrieemissionen in Luft und Wasser: Kupfer
in: Nutztiervergiftungen
Hrsg.: BENTZ, H.
Jena, VEB Gustav Fischer Verlag, 1969
79. LAL, S. und T.L. SOURKES
Intracellular distribution of copper in the liver during
chronic administration of copper sulfate to the rat
Toxicol. Appl. Pharmacol. 18, 562, 1971
80. LAMBIN, S., S.BAZIN und A.SALAS
Actions des sels de cuivre sur les érythrocytes
Annls Inst. Pasteur (Paris), 81, 572, 1951
81. LANG, K.
Biochemie der Ernährung, 357 ff
Darmstadt, Dr.Dietrich Steinkopf Verlag, 1970
82. LEESER, O.
Mineralische Arzneimittelstoffe
in: Lehrbuch der Hömöopathie, 701 - 711
Heidelberg, Karl F. Haug Verlag, 1968
83. LINDQUIST, R.R.
Studies on the pathogenesis of the hepatolenticular
degeneration
I. Acid phosphatase activity in copper loaded liver
Amer. J. Pathol. 51, 471, 1967

84. LINDQUIST, R.R.
Studies on the pathogenesis of the hepatolenticular degeneration
III. The effect of copper in rat liver lysosomes
Amer. J. Pathol. 53, 903, 1968
85. LIPPERT, T.H.
Über die Albumin-Kupferbindung geprüft durch die Reaktion des Meerschweinchenileums
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 253, 433, 1966
86. LOCKNER, D., U.ERICSON und G.HEVESY
Copper turnover in blood plasma
Acta haemat. 33, 1, 1965
87. LÖHR, G.W. und H.D. WALLER
Pharmakogenetik und Präventivmedizin
Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 1966
88. LÜKE, F. und H. WIEMANN
Chronische Kupfervergiftungen und Kupferretention in der Leber bei Schafen verschiedener Rassen
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 83, 253, 1970
89. MACPHERSON, A. und R.G. HEMINGWAY
The relative merit of various blood analyses and liver function test in giving an early diagnosis of chronic copper poisoning in sheep
Brit. vet. J. 125, 213, 1969
90. MAHONEY, J.P., J.A. BUSH, C.J. GUBLER, W.H.MORETZ, G.E.CARTWRIGHT und M.M.WINTROBE
Studies on copper metabolism
XV. The excretion of copper by animals
J. Lab. clin. Med. 46, 702, 1953

91. MANN, T. und D. KEILIN
Hemocuprein, a copper-protein compound of red
blood corpuscles
Nature, Lond. 142, 148, 1938
92. MARCILESE, N.A., C.B.AMMERMANN, R.M.VALSECCHI,
B.G.DUNAVANT und G.K.DAVIS
Effect of dietary molybdenum and sulfate upon uri-
nary excretion of copper in sheep
J. Nutr. 100, 1399, 1970
93. MARSTON, H.R.
The organisation and work of the division of bio-
chemistry and general nutrition of C.S.I.R.
Proc. Roy. Soc. 199, Serie A 273, 1949
94. MARSTON, H.R.
Cobalt, copper and molybdenum in the nutrition of
animals and plants
Physiol. Rev. 32, 66, 1952
95. MARSTON, H.R. und S.H. ALLEN
Function of copper in the metabolism of iron
Nature, Lond. 215, 645, 1967
96. MATRONE, G., C.CONLEY, G.WISE und R.WAUGH
A study of iron and copper requirements of dairy calves
J. dairy Sci. 40, 1437, 1957
97. MAYO, R.H., S.M.HAUGE, H.E.PARKER, F.N.ANDREWS
und C.W.CARRICK
Copper tolerance of young chickens .
Poult. Sci. 35, 1156, 1956

98. MCCALL, J.T., N.P.GOLDSTEIN und L.H.SMITH
Implications of trace metals in human disease
Fed. Proc. Amer. Soc. exp. Biol. 30, 1011, 1971

99. MCCOSKER, P.J.
Observations on blood copper in the sheep
I. Normal copper status and variations induced by
different conditions
Res. Vet. Sci. 9, 91, 1968

100. MCNARY, W.F.Jr.
The intrahepatic and intracellular distribution of
copper following chronic administration of the me-
tal in the diet
Anat. Rec. 146, 193, 1963

101. MEHRING, A.L., J.H.BRUMBAUGH, A.J.SUTHERLAND und
H.W.TITUS
The tolerance of growing chickens for dietary copper
Poult. Sci. 39, 713, 1960

102. MERKER, H.J.
Struktur und Funktion der Lysosomen
Mat. Med. Nordmark, XVII, 657, 1965

103. MERKULOVA, I.S., V.R.SOROKA und N.Z.RUDENKO
Absorption of ionized and complex bound copper in
the stomach and the small intestine
Byul. eksp. biol. Med. 66, 56, 1968

104. MILNE, D.B. und P.H. WESWIG
Effect of supplementary copper on blood and liver
copper-containing fractions in rat
J. Nutr. 92, 429, 1968

105. MISTILIS, S.P. und P.A. FARRER
The absorption of biliary and non-biliary radio-
copper in the rat
Scand. J. Gastroenterol. 3, 586, 1968
106. MISTILIS, S.P. und P.T. MEARRICK
The absorption of ionic, biliary and plasma radio-
copper in the neonatal rat
Scand. J. Gastroenterol. 4, 691, 1969
107. MÜLLER, W.
Das α -Ceruloplasmin
in: Handbuch der inneren Medizin Bd. II/1, 49 ff
Hrsg.: HEILMEYER, L.
Berlin-Heidelberg-New York, Springer Verlag, 1968
108. NEETHLING, L.P., M.M. BROWN und P.J. DE WET
The low toxicity, absorption, turnover and excretion
of copper in the merino sheep
J. S. Afr. vet. med. Ass. 39, 13, 1968
109. NEUMANN, P.Z. und M. SILVERBERG
Metabolic pathway of red blood cell copper in normal
human and in WILSON's disease
Nature, Lond. 213, 775, 1967
110. NILSSON, N.G.
Kopparförgiftung hos får
Nord. vet. Med. 20, 249, 1968
111. OSAKI, SH., D.A. JOHNSON und E. FRIEDEN
The possible significance of ferrous oxidase activity
of ceruloplasmin in normal human serum
J. biol. Chem. 241, 2746, 1966

112. OWEN JR., CH.A.
Distribution of copper in the rat
Amer. J. Physiol. 207, 446, 1964
113. OWEN JR., CH.A.
Metabolism of radiocopper in the rat
Amer. J. Physiol. 209, 900, 1965
114. OWEN JR., CH.A. und J.B. HAZELRIG
Metabolism of copper 64 labeled copper by the
isolated rat liver
Amer. J. Physiol. 210, 1059, 1966
115. PASWELL, J., B.E. COHEN, I.B. BASSAT, B. RAMOT,
M. SHCHORY und U. LAVI
Hemolysis in WILSON's disease:
The role of glucose-6-phosphatdehydrogenase inhibition
Isr. J. med. Sci. 6, 549, 1970
116. PEARSON, J.K.
Copper poisoning in sheep following the feeding
of a copper diet
Vet. Rec. 68, 766, 1956
117. PORTER, H.
Tissue copper proteins
in: The biochemistry of copper, 159 - 174
Eds.: PEISACH, J., P. AISEN und W.E. BLUMBERG
New York-London, Academic Press, 1966
118. PRYOR, W.J.
The distribution of copper in bovine and ovine
foetuses with reference to their age maternal
liver copper concentrations
Res. Vet. Sci. 2, 123, 1964

119. ROSS, D.B.
Chronic copper poisoning in lambs
Vet. Rec. 76, 875, 1964
120. ROSS, D.B.
The diagnosis, prevention and treatment of chronic
copper poisoning in housed lambs
Brit. J. Vet. 122, 279, 1966
121. RUSSANOV, E. und P. BALEWSKA
Über den Kupferstoffwechsel in den Leberzellen
Verh. Dt. Ges. exp. Med. 16, 296, 1967
122. SACHS, H., V.E.LEVINE, A.SCHMITT und R.HUGHES
Rise in serum copper following oral administration
of copper sulfate
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 46, 192, 1941
123. SACHS, H., V.E.LEVINE, F.C.HILL und R.HUGHES
Copper and iron in human blood
Archs. intern. Med. 71, 489, 1943
124. SALVATI, A.M., M.T.AMBROGIONI und L.TENTORI
The autoxidation of hemoglobin
Ital. J. Biochem. 18, 1, 1969
125. SARKAR, B. und T.P.A. KRUCK
Copper-aminoacid complexes in human serum
in: The biochemistry of copper, 183 - 196
Eds.: PEISACH, J., P.AISEN und W.E.BLUMBERG
New York-London, Academic Press, 1966

126. SCHAPER, M. und F. LÜTJE
Kupfervergiftungen unter Schafen und Rindern nach
Bekämpfung der Obstbaumschädlinge mit Kupfersulfat
im Jahre 1928
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 47, 49, 1931
127. SCHEINBERG, I.H. und I. STERNLIEB
WILSON's disease and the concentration of cerulo-
plasmin in the serum
Lancet, 1, 1420, 1963
128. SCHEINBERG, I.H.
Ceruloplasmin, a review
in: The biochemistry of copper, 513 - 524
Eds.: PEISACH, J., P. AISEN und W.E. BLUMBERG
New York-London, Academic Press, 1966
129. SCHEINBERG, I.H. und I. STERNLIEB
WILSON's disease
Ann. Rev. Med. 16, 119, 1965
130. SCOTT, E.M., I.W. DUNCAN und V. EKSTRAND
The reduced pyridine nucleotide dehydrogenases of
human erythrocytes
J. biol. Chem. 240, 481, 1965
131. SHAND, A. und G. LEWIS
Chronic copper poisoning in young calves
Vet. Rec. 69, 618, 1957
132. SHAPOSHNIKOV, A.M., Y.N. ZUBZHITSKII und G.V. MUKHA
Organ and intracellular localisation of cerulo-
plasmin biosynthesis
Biokhimiya 33, 629, 1968

133. SIEBERT, G.
Biochemie der Zellstrukturen D: Lysosomen
in: Handbuch der allgemeinen Pathologie Bd. II/5
Hrsg.: ALTMANN, H.W., F.BÜCHNER, H.COTTIER, G.HOLLE,
E.LETTERER, W.MASSHOFFER, H.MEESEN, F.ROULET,
G.SEIFERT, G.SIEBERT und A.STUDER
Berlin-Heidelberg-New York, Springer Verlag, 1968
134. SMEENK, J.
Zwei Fälle von Kupfervergiftung bei Schafen
Tijdschr. Diergeneesk. 96, 341, 1971
135. SNYDER, H.E. und H.B. SKRDLANT
The influence of metallic ions on the autoxidation
of oxyhemoglobin
J. Food. Sci. 31, 468, 1966
136. SPAIS, A.G.
Cuivre en pathologie ovine et bovine
Recl. méd. vét. 135, 161, 1959
137. STEINBUCH, M.
La céruloplasmin
Rév. Hématol. 13, 387, 1958
138. STOLK, J.M. und R.P. SMITH
Species differences in methemoglobin reductase
activity
Biochem. Pharmacol. 15, 342, 1966
139. SUTTER, M.D., D.C.RAWSON, J.A.MCKNOWN und A.R.HASKELL
Chronic copper toxicosis in sheep
Amer. J. vet. Res. 19, 890, 1958

140. SZÖKE, K. und T. ZEMPLEIN
Die Wirkung von Kupferverunreinigungen auf den Vitamin C-Haushalt bei Ratten und Meerschweinchen
Int. Z. Vitaminforsch. 32, 269, 1962
141. TAIT, R.M., C.R.KRISHNMURTI, E.W.GILCHRIST und K.MACDONALD
Chronic copper poisoning in feeder lambs
Can. med. vet. J. 12, 73, 1971
142. TODD, J.R.
Chronic copper poisoning in farm animals
Vet. Bull. 32, 573, 1962
143. TODD, J.R. und J.F. GRACEY
Chronic copper poisoning in young heifer
Vet. Rec. 71, 145, 1959
144. TODD, J.R. und R.H. THOMPSON
Methemoglobin in chronic copper poisoning of sheep
Nature, Lond. 191, 89, 1961
145. TODD, J.R., J.F.GRACEY und R.H.THOMPSON
Studies on chronic copper poisoning
I. Toxicity of copper sulfate and copper acetate in sheep
Brit. vet. J. 118, 482, 1962
146. TODD, J.R. und R.H. THOMPSON
Studies on chronic copper poisoning
II. Biochemical studies on the blood during the hemolytic crisis
Brit. vet. J. 119, 161, 1963

147. TODD, J.R. und R.H. THOMPSON
Studies on chronic copper poisoning
III. Effects of copper acetate injected into the
bloodstream of sheep
J. Comp. Path. Ther. 74, 542, 1964
148. TODD, J.R. und R.H. THOMPSON
Studies on chronic copper poisoning
IV. Biochemistry of toxic syndrome in the calf
Brit. vet. J. 121, 90, 1965
149. TOMOV, A. und N. NAJDENOV, (1963) zit. nach
WIESNER, E. (164)
150. UNDERWOOD, E.J.
Trace elements in human and animal nutrition
New York-London, Academic Press, 1962
151. VARITY, M.A., J.K.GAMBELL, A.R.REITH und W.J.BROWN
Subcellular distribution and enzyme changes following
subacute copper intoxication
Lab. Invest. 16, 580, 1967
152. VOHRA, P. und F.H. KRATZER
Zink, copper, manganese toxicities in turkey poults
and their alleviation by EDTA
Poult. Sci. 47, 699, 1968
153. WALSHE, J.M.
WILSON's disease, a review
in: The biochemistry of copper, 475 - 502
Eds.: PEISACH, J., P. AISEN und W.E.BLUMBERG
New York-London, Academic Press, 1966

154. WEISS, E. und B. SCHIEFER
Ikterus und Leberzirrhose bei Kälbern
Bayr. Tierärztebl. 16, 218, 1965
155. WEISS, E., P. BAUR und P. PLANK
Die chronische Kupfervergiftung des Kalbes
Vet. Med. Nachr. 1, 35, 1967
156. WEISSMANN, G.
Lysosomes
Blood 24, 594, 1964
157. WEISSMANN, G.
Lysosomes
New Engl. J. Med. 273, 1084 ff und 1143 ff, 1965
158. WEISSMANN, G. und L. THOMAS
The effects of corticosteroids upon connective
tissue and lysosomes
Recent Prog. Horm. Res. 20, 215, 1964
159. WENSWOORT, P. und E. G. HOSKAM
Kupfervergiftung bei Schafen nach längerer Kraft-
futterfütterung
Ref. Landw. Zentr. Bl. III, 829, 1963
160. WESSEL, E., P. GEDICK und O. GIESBERG
Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die
Speicherung organisch gebundenen Kupfers in der Leber
Verh. dt. Ges. Path. 49. Tagung, 296, 1965
161. WESSEL, E., P. GEDICK und O. GIESBERG
Elektronenmikroskopische und morphometrische Unter-
suchungen an Kaninchenlebern nach der i.v. Injektion
organisch gebundenen Kupfers
Virchows Arch. path. Anat. Physiol. 340, 206, 1966

162. WIEMANN, H.
Kupfervergiftungen durch Hüttenrauch
Dt. tierärztl. Wschr. 47, 279, 1939
163. WIENER, G. und A.C. FIELD
Blood copper levels in sheep in relation to genetic
factors, parity and previous history
Nature, Lond. 209, 835, 1963
164. WIESNER, E.
Ernährungsschäden der landwirtschaftlichen Nutztiere
Jena, VEB Gustav Fischer Verlag, 1970
165. WORWOOD, M. und D.M. TAYLOR
Subcellular distribution of copper in rat liver
after biliary obstruction
Biochem. Med. 3, 105, 1969
166. ZUCKERKANDL, W. und W.A. SCHNEIDER
Aminoacidcomposition of the polypeptid chains
of Gorilla hemoglobin
Nature, Lond. 192, 984, 1961

Herrn Prof. Dr. J. KALICH, dem komm. Vorstand
des Instituts für Pharmakologie, Toxikologie und
Pharmazie, danke ich für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen am Institut.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. A. SCHMID
für die Überlassung des Themas, für die jederzeit
gewährte Unterstützung und für die wertvollen Anregungen bei der Durchführung dieser Arbeit.

LEBENS LAUF

Geburtstag : 31-5-1943

Geburtsort : München

Eltern : Laura Steiner, geb. Prem
Franz Steiner, Elektroingenieur

Familienstand : seit 3-12-1971 verheiratet mit der
Luftfahrtangestellten Karin, geb.
Leenen

Schul Ausbildung : nach dem Besuch der Volksschule
Übertritt in das Albert-Einstein-
Gymnasium München, Abitur 1964

Studium : ab Sommersemester 1965 Studium der
Veterinärmedizin an der Universität
München

Staatsexamen : 1970

Approbation : 1970

